

Aus der Klinik für Neurologie und dem Institut für Humangenetik der Medizinischen
Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchung somatischer Chromosomenveränderungen bei amyotropher Lateralsklerose

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr.med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

Von Juliane Christin Wappler
aus Bautzen

Gutachter: 1. PD Dr. med. Th. Meyer
2. Prof. Dr. rer. nat. B. Royer-Pokora
3. PD Dr. med. Chr. Münch

Datum der Promotion: 08.06.2006

Zusammenfassung

Die amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist eine fortschreitende neurodegenerative Erkrankung, deren Symptome durch den Untergang der Motoneuronen bedingt sind. Neueste zytogenetische Untersuchungen zeigen ein vermehrtes Auftreten konstitutioneller Chromosomenveränderungen in Form von Translokationen und Inversionen bei ALS-Patienten. Dies lässt eine Verbindung zwischen dem Ausbruch der Erkrankung und der auffälligen Zytogenetik vermuten. Das Auftreten spontaner, nicht konstitutioneller Chromosomenveränderungen als Zeichen einer chromosomalen Instabilität wurde in der vorliegenden Arbeit an ALS-Patienten untersucht. METHODE: Neben der konventionellen Karyotypisierung nach GTG-Bänderung, der Bestimmung der SCE-Rate und der Bruchrate nach Behandlung mit Bleomycin kam die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung zum Einsatz. Die Untersuchungen wurden an Patienten mit sporadischer ALS (45), an Kontrollpersonen (38) und Verwandten (9) durchgeführt. ERGEBNISSE: Die Karyotypisierung ergab bei den Patienten eine spontane Translokationsrate von 0,02 Translokationen/Zelle, bei den Kontrollen 0,04 Translokationen/Zelle. Weitere numerische oder strukturelle Auffälligkeiten waren nicht signifikant verschieden. Es wurden keine konstitutionellen Chromosomenaberrationen gefunden. Die Häufigkeit der Schwesterchromatidaustausche (SCE-Rate) bewegte sich mit 7-8 SCE/Zelle in der Patientengruppe sowie in der Kontrollgruppe innerhalb der Normwerte. Durch die Zugabe von Bleomycin in die Zellkultur stieg die Zahl der Chromatidbrüche von 0,0 auf 0,8 Brüche/Zelle an. Dabei zeigten die untersuchten Gruppen ähnliche Progredienzen in den Bruchraten. Mit der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung werden quantitative Aussagen über spontane Translokationsraten gemacht. Sie betrug in der Kontroll- und Patientengruppe 0,03 bis 0,04 Translokationen/Zelle. DISKUSSION: Die vorliegenden Ergebnisse liefern keinen Anhalt für eine chromosomale Instabilität als Risikofaktor für die Entstehung der sporadischen ALS. Indizien für eine chromosomale Instabilität wie erhöhte Raten induzierter Chromatidbrüche und

Schwesterchromatidaustausche als auch vermehrtes Auftreten somatischer Translokationen und anderer struktureller Aberrationen konnten bei den ALS-Patienten nicht nachgewiesen werden. Über mögliche Auffälligkeiten in den Motoneuronen lässt sich allerdings mit den Untersuchungen an Blutlymphozyten keine hinreichend sichere Aussage machen.

Abstract

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a progressive neurodegenerative disease which is characterized by the degeneration of motor neurons. Recently, a high rate of constitutional structural chromosomal rearrangements has been reported in apparently sporadic ALS patients. It remains questionable whether or not these genomic rearrangements are caused by a chromosomal instability involved in the pathogenesis of the disease. Therefore, we performed different cytogenetic studies on chromosomal instability. **METHOD:** We performed chromosome analyses from patients (N=45), control subjects (N=38), and relatives (N=9) after culturing blood lymphocytes. Conventional chromosome analysis after GTG-banding, chromosomal breakage test after Bleomycin treatment, the rate of sister chromatid exchange (SCE), and whole chromosome painting were used for these analyses. **RESULTS:** Neither karyotyping nor whole chromosome painting revealed higher levels of structural or numerical aberrations in lymphocytes of patients with sALS. After karyotyping we found

0.02 t/cell in patients and 0.04 t/cell in controls. Whole chromosome painting revealed 0.04 t/cell in patients and 0.03 t/cell in controls. The chromosomal breaks increased likewise after Bleomycin treatment in the control group and the patient group as well. Cell cultures without Bleomycin did not show any breaks while the highest Bleomycin concentration induced up to 0.08 breaks/cell. The SCE rate in patients which corresponds to the chromatid repair activity did not rise to a higher level than in the control individuals. Both groups were in the normal range of 7 to 8 SCE/cell. **DISCUSSION:** The pathomechanism of neurodegeneration in ALS patients is still unknown. We tried to find a cytogenetic correlative being a risk factor for the development of ALS. However, so far there is no clue for chromosomal instability being involved in the neurodegenerative process.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	3
Abstract	5
Widmung	8
Abkürzungsverzeichnis.....	9
Vorwort	10
1 Einleitung.....	11
1.1 Pathogenese und Ätiologie der ALS.....	13
1.2 Chromosomenaberrationen.....	15
1.3 Fragestellung	22
2 Material und Methoden.....	24
2.1 Patienten, Verwandte und Kontrollpersonen	24
2.2 Geräte	28
2.3 Chemikalien	29
2.4 Lymphozytenkultur, Aufarbeitung und GTG-Bänderung.....	31
2.5 SCE-Färbung	33
2.6 Induzierte Chromosomenbruchrate nach Bleomycinbehandlung	35
2.7 Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung.....	36
3 Ergebnisse	39
3.1 Karyotypisierung und Chromosomenanalyse.....	39
3.2 Analyse der SCE-Rate	43
3.3 Bestimmung der spontanen und induzierten Bruchrate mit Bleomycin	48
3.4 Bestimmung der Translokationsrate mittels Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung	54

4	Diskussion	58
4.1	Material: Lymphozyten statt Motoneuronen	59
4.2	Methodenwahl: Bänderung versus FISH	60
4.3	Induzierte Chromatidbrüche	62
4.4	Schwesterchromatidaustausch (SCE).....	63
4.5	Oxidativer Stress, DNA-Schädigung und Neurodegeneration	64
	Literaturverzeichnis	70
	Anhang	74
	Danksagung	75
	Eidesstattliche Erklärung	76

Widmung

Diese Arbeit ist von ganzem Herzen meinen lieben Eltern gewidmet.

Abkürzungsverzeichnis

ALS	amyotrophe Lateralsklerose
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid</i>
AT	Adenin-Thymin
BrdU	Bromodesoxyuracil
B/EZ	Brüche/Einzelzelle
B/Z	Brüche/Zelle
COX-2	Cyclooxygenase-2
csb	<i>chromosome break</i> (Chromosomenbruch)
ctb	<i>chromatid break</i> (Chromatidbruch)
ctg	<i>chromatid gap</i> (Färbelücke)
DAPI	Diamidinophenylindol
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
fALS	familiäre ALS
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
GC	Guanin-Cytosin
GluR	Glutamatrezeptor
GTG	G-Banden nach Trypsinierung mit Giemsa
MN	Motoneuron
NMDA	<i>N-methyl-D-aspartate</i>
PBS	<i>phosphate buffered salin</i> (Phosphatpuffer)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium (Zellkulturmedium)
sALS	sporadische ALS
SCE	<i>sister chromatid exchanges</i>
SOD-1	Superoxiddismutase-1
U-Test	nach Mann und Whitney durchgeführter Vergleich von zwei unabhängigen Stichproben
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WCP	<i>whole chromosome painting</i>

Vorwort

„So zog sich alles hin. Alik ging ins Krankenhaus, kam wieder raus, ging wieder rein, kam wieder raus. Schwer zu sagen, ob die Behandlung anschlug, denn wer weiß, wie es ohne sie ausgesehen hätte. Aber der rechte Arm baumelte schon leblos herab, und mit der linken Hand konnte er kaum noch den Löffel zum Mund führen. Sein Gang veränderte sich. Er ermüdete schnell. Stolperte oft. Dann fiel er das erste Mal hin. Und das alles ging beängstigend rasch. Im Frühjahr darauf konnte er schon kaum noch laufen [...]“

Ljudmila Ulitzkaja, aus: *„Ein fröhliches Begräbnis“*

1 Einleitung

Das Erreichen eines hohen Lebensalters wird durch ein umfassendes Kontrollsystem gewährleistet, das zahlreiche fehlerhafte Prozesse in unseren Zellen entdecken und beheben kann. Die Ursache unseres Alterns und Sterbens ist letztlich das Unvermögen des Kontrollsystems, die sich häufenden Fehlleistungen zu bewältigen. Die Bewältigung von DNA-Schäden erfolgt durch DNA-Reparatur oder durch den programmierten Zelltod. Bei degenerativen Krankheiten sind die vorzeitige Störung der DNA-Reparatur sowie der programmierte Zelltod als Ursache zu diskutieren. Die amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist eine neurodegenerative Systemerkrankung, bei der die Motoneuronen, die Nervenzellen des motorischen Systems, betroffen sind.

Um die Symptome der ALS zu verstehen, muss man die Anatomie des Pyramidenbahnsystems genauer betrachten. Die elektrische Erregung wird im ersten Motoneuron im *Gyrus praecentralis* der Großhirnrinde generiert. Jede Nervenzelle hat einen Zellfortsatz, das Axon, in dem die Erregung weitergeleitet wird. Die Axone der ersten Motoneurone laufen gebündelt im *Tractus corticospinalis* im Vorderhorn des Rückenmarks. Dort erfolgt die Überleitung der Erregung auf das zweite Motoneuron, dessen Axon in einem Nerv aus dem Rückenmark austritt und zur Muskelzelle gelangt. Die Innervation der Schlund-, Schluck-, Kau- und Zungenmuskulatur erfolgt durch motorische Hirnnerven. Die Erregungsüberleitung vom zweiten Motoneuron auf die Muskelzelle wird durch die Verbreiterung des Axons zur motorischen Endplatte optimiert. Durch die elektromechanische Kopplung in der Muskelzelle löst das ankommende Aktionspotential die Muskelkontraktion aus (www.als-charite.de).

Die ALS ist die häufigste degenerative Erkrankung des Pyramidenbahnsystems. Sie ist eine kombinierte Degeneration des ersten und zweiten Motoneurons. Morphologisch besteht ein Untergang der Pyramidenzellen im motorischen Rindenareal und deren Axone in der Pyramidenbahn sowie des 2. Motoneurons im Bulbär- und Rückenmark. Die Pyramidenbahndegeneration gibt der Krankheit auch ihren Namen „Lateralsklerose“, weil die entstehende Bindegewebsnarbe dem Gewebe eine feste Konsistenz verleiht. Das dominierende Symptom, die Muskelatrophie infolge mangelnder nervaler Stimulation, findet sich ebenfalls im

Namen wieder: „amyotroph“.

Die klassische Form der ALS ist gekennzeichnet durch die Symptome der Degeneration des ersten und zweiten Motoneurons. Der Beginn der Erkrankung stellt sich in überwiegender Zahl als eine Muskelschwäche dar. Dabei manifestiert sich die Kraftminderung je nach der zuerst betroffenen Muskelpartie in völlig unterschiedlicher Weise. In 80 % der Fälle ist die periphere Extremitätenmuskulatur betroffen. Es kommt zu Ungeschicklichkeit der Hände oder zu einer Gangunsicherheit und Schwäche der Beine. Weitere mögliche Frühsymptome sind Symptome des zweiten Motoneurons, wie Muskelatrophie und Spastik, und Muskelkrämpfe, v.a. in der Wadenmuskulatur.

Grundsätzlich ist zwischen dem Krankheitsbeginn an den Extremitäten (spinale Atrophie) und einer weniger häufigen Verlaufsform zu unterscheiden, die mit Sprech- und Schluckstörungen beginnt (bulbärer Krankheitsbeginn). An der bulbären Verlaufsform leiden zu Beginn etwa 20 % der Patienten. Sensibilität und Gedächtnisfunktion, sowie Stuhl- und Harnkontrolle bleiben vom Krankheitsprozess in der Regel ausgespart. Spastik und Reflexsteigerung als Symptome des ersten Motoneurons kommen erst im weiteren Krankheitsverlauf zur Ausprägung (www.als-charite.de).

Der Symptomenkomplex der ALS wurde erstmals 1873 von dem Pariser Neurologen Jean Martin Charcot detailliert beschrieben (Charcot, 1873). Von der Erstbeschreibung bis zu ersten Erkenntnissen über die Ätiologie der ALS sind seitdem über 100 Jahre vergangen. Im Jahr 1993 fand man bei einem kleinen Teil der Patienten Genmutationen im Superoxid-Dismutase-Gen, die ursächlich mit der familiären ALS in Verbindung zu bringen sind (Rosen et al., 1993). Bis heute wurden viele ätiologische Hypothesen aufgestellt, die später widerlegt oder deren pathogenetische Verbindung auf einige Patienten beschränkt werden mussten.

Die ALS ist eine rasch verlaufende und unheilbare Krankheit, deren Therapie bislang fast ausschließlich symptomatisch ist. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt zwischen 50 und 70 Jahren. Prävalenzdaten der ALS bewegen sich zwischen 0,8 und 8,4/100000 Einwohner. Die Inzidenz liegt zwischen 0,6 und 2,4/100000 Einwohner/Jahr. Früh Erkrankte haben häufig eine längere Überlebenszeit als spät Erkrankte. Die durchschnittliche Überlebenszeit beträgt 3-5 Jahre. Bei einigen Sonderformen der ALS kann sie um Jahre verlängert sein. Die Todesursache ist in

den meisten Fällen die zunehmende Schwäche der Atemmuskulatur in Form einer Zwerchfellparese (Neundörfer, 2002).

1.1 Pathogenese und Ätiologie der ALS

Erste Ansatzpunkte zum Pathomechanismus der ALS lieferte die Patientengruppe mit familiärer ALS (5 % der ALS-Patienten, fALS). Diese Patienten unterscheiden sich von den Patienten mit sporadischer ALS (95 % der ALS-Patienten, sALS) durch eine positive Familienanamnese mit meist autosomal-dominantem Erbgang, sind jedoch phänotypisch nicht abgrenzbar. Die fALS-Patienten haben keinen einheitlichen Gendefekt. Nur 15-20 % der fALS-Patienten zeigen eine Mutation im Superoxid-Dismutase-Gen auf Chromosom 21q (Rosen et al., 1993). Die Mutation hat den Neuerwerb einer bisher unbekannten Funktion der Superoxid-Dismutase-1 zur Folge. Die *gain of function* hat eine Anreicherung freier Radikale, z.B. toxischer Peroxynitrite, in der Zelle zur Folge. Freie Radikale werden als Risikofaktoren für Membranstabilität, genotoxische Effekte und Proteindegeneration angesehen (Wong et al., 1995). Es sind bisher 7 weitere Genloci beschrieben worden, deren Mutationen mit der Ursache der fALS in Verbindung gebracht werden (Hentati et al., 1998; Chance et al., 1998; Hosler et al., 2000; Hand et al., 2002; Ruddy et al., 2003; Sapp et al., 2003).

Tabelle 1: fALS Genloci. Erbmodus autosomal-dominant (AD) bzw. autosomalrezessiv (AR)

Gen-ort	Erb-modus	Produkt	Beginn	Phäno- typ	Häufigkeit	Referenz
21q	AD	SOD1	adult	variabel	10 % der FALS	Rosen et al., 1993
2q33	AR	ALS2	juvenil	langsam, >1.MN	Nordafrika, Kuwait	Hadano et al., 2001
15q15-15q22	AR	?	adult	langsam, nicht bulbär	häufigste AR-ALS	Hentati et al., 1998
9q34	AD	?	juvenil	variabel	sehr selten	Chance et al., 1998
9q21	AD	?	adult	ALSFTD	selten	Hosler et al., 2000
18q12	AD	?	adult	typisch	selten	Hand et al., 2002
16q12	AD	?	adult	typisch	wahrsch. häufig	Ruddy et al., 2003
20p	AD	?	adult	typisch	unbekannt	Sapp et al., 2003

Die Ätiologie der sporadischen ALS ist weiterhin ungeklärt. Es gibt verschiedene Untersuchungen, die oxidativen Stress ursächlich mit der Neurodegeneration in Zusammenhang bringen (Bogdanov et al., 2000; Migliore et al., 2002; Zhu et al., 2004). Des Weiteren wird auch die Beteiligung glutamatvermittelter Exzitotoxizität an neurodegenerativen Prozessen diskutiert (Heath/Shaw, 2002; Tateno et al., 2004). Diese Hypothese wird durch den positiven Effekt auf den Krankheitsverlauf durch die Blockierung der präsynaptischen Glutamatfreisetzung mit dem Medikament Riluzol bestätigt. Die Blockierung der Glutamatfreisetzung senkt die Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt und damit die Stimulation der Glutamatrezeptoren an der postsynaptischen Zelle. In zwei plazebokontrollierten klinischen Studien mit ALS-Patienten wurde die lebensverlängernde Wirkung des Medikaments Riluzol nachgewiesen (Bensimon et al., 1994; Hugon, 1996) und ist als Standardtherapie seit 1996 zugelassen. Verschiedene Autoren gehen davon aus, dass DNA-Schäden

eine direkte Ursache der Zelldegeneration sind (Rolig et al., 2000; Uberti et al., 2003; Barzilai et al., 2004; Caldecott, 2004).

Untersuchungen an Parkinsonpatienten haben gezeigt, dass nicht nur in den Neuronen durch oxidativen Stress verursachte DNA-Schäden auftreten, sondern auch Lymphozyten Veränderungen in der DNA aufweisen können, die auf oxidativen Stress zurückzuführen sind (Migliore et al., 2002). Auch in Neuronen von ALS-Patienten konnten oxidative DNA-Schäden nachgewiesen werden (Facchinetti et al., 1998; Bogdanov et al., 2000). Im Folgenden werden die zytogenetisch sichtbaren Auswirkungen der DNA-Schäden und die zum Verständnis notwendige Zytogenetik näher erläutert.

1.2 Chromosomenaberrationen

Das Erbgut des Menschen ist in jedem Zellkern gespeichert. Durch die spezifische Abfolge der Basen der Desoxyribonukleinsäure (DNA) sind im menschlichen Genom 30.000 -40.000 Gene kodiert. Diese Gene sind auf 23 Chromosomenpaare verteilt. Jedes Chromosomenpaar besteht aus homologen Chromosomen, von denen eines von der Mutter und das andere vom Vater stammt. Die homologen Chromosomen kodieren für dieselben Gene, wobei aber unterschiedliche Allele desselben Gens vorliegen können. Die 22 Autosomen sind mit abnehmender Größe von 1-22 nummeriert, wobei Chromosom 21 kleiner ist als Chromosom 22. Die Geschlechtschromosomen X und Y, auch Gonosomen genannt, haben eine gesonderte Position im Karyogramm. Die Chromosomen werden durch das Zentromer in einen p-Arm und einen q-Arm unterteilt. Sind die Arme annähernd gleich lang, spricht man von metazentrischen Chromosomen, submetazentrisch bei einem kürzeren p-Arm und akrozentrisch bei p-Armen in Form von Satelliten.

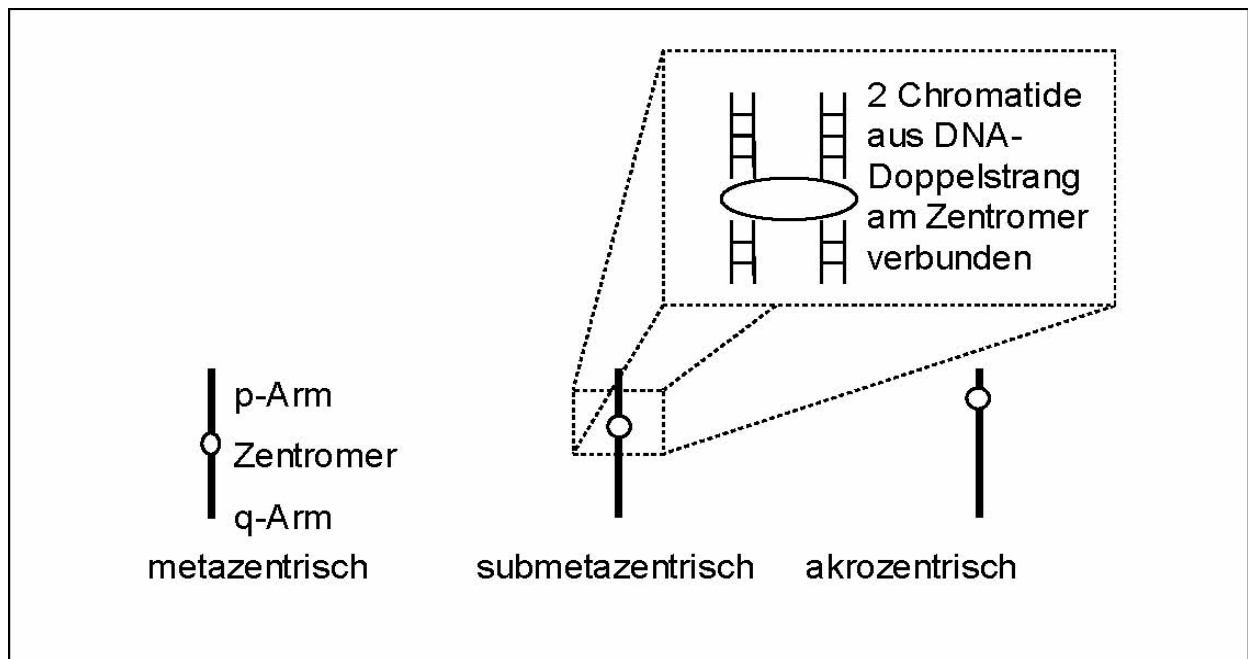


Abbildung 1: Chromosomennomenklatur.

Während sich die Chromosomen in der Mitose (Zellteilung der somatischen Zellen) befinden, bestehen sie aus zwei Schwesterchromatiden, die am Zentromer miteinander verbunden sind. Erst in der Anaphase der Mitose trennen sich die Zentromere, je ein Schwesterchromatid gelangt in eine Tochterzelle. Die Verteilung der Gene auf die Chromosomen ist nicht nur von ihrer Größe abhängig, so haben zum Beispiel die Chromosomen 13, 18 und 21 den geringsten Anteil am Erbgut. Das Vorkommen von drei statt zwei homologen Chromosomen (Trisomie) ist aufgrund der geringen Gendichte nur bei den Chromosomen 13, 18 und 21 mit dem Leben vereinbar. Trisomien anderer Chromosomen führen zur genetischen Imbalance und damit zu Proteinsynthesestörungen (Sperling/Neitzel, 2000).

Jede Zelle durchläuft einen Zellzyklus, der aus der Interphase und der Kern- und Zellteilungsphase besteht. In der Interphase finden Proteinsynthese (G1-Phase), DNA-Synthese (S-Phase) und eine weitere Proteinsynthese (G2-Phase) statt. In der Mitose werden die Chromosomen um das 10.000fache kondensiert. In diesem Zustand werden die Chromosomen auf die Tochterzellen verteilt. Das genetische Material ist in dieser Phase inaktiv, d.h. die Transkription ist eingestellt. Nach Abschluss der Mitose gehen so genannte postmitotische Zellen in die G0-Phase. Werden diese Zellen in vitro zur Zellteilung stimuliert, können sie wieder in die G1-Phase des Zellzyklus eintreten. Zu den postmitotischen Zellen zählen die T-

Lymphozyten und die Nervenzellen.

Wenn eine Schädigung der DNA vorliegt oder die räumliche Anordnung der Chromosomen fehlerhaft ist, kann der Zyklus so lange blockiert werden, bis Kontrollstationen die Reparaturprozesse aktiviert haben. Im Fall einer gravierenden Schädigung wird die Apoptose und damit die Elimination der betroffenen Zelle eingeleitet. An den *DNA damage checkpoints* sind ganze Proteinkaskaden beteiligt, die DNA-Schäden erkennen und reparieren. Wie komplex der Kontrollmechanismus ist, wird durch die Vielzahl der Genmutationen deutlich, die mit einer erhöhten Chromosomeninstabilität (z.B. NBS-Genmutation) und einem erhöhten Tumorrisiko (z.B. TP53-Genmutation) einhergehen. Sowohl Chromosomeninstabilität als auch Entartung sind Zeichen mangelnder DNA-Reparatur. Ein wichtiges Protein im Kontrollsystem von DNA-Schäden ist das Protein p53, welches sowohl DNA-Reparatur als auch die Apoptose der geschädigten Zelle veranlassen kann. Neben den DNA-Schäden müssen die numerischen Aberrationen erkannt und verhindert werden. Dazu dient der Spindelkontrollpunkt, der die gleichmäßige Aufteilung der Schwesterchromatiden in der Mitose auf die beiden Tochterzellen gewährleistet. Treten Mutationen in Genen dieser Kontrollproteine auf, so kommt es häufiger zu Chromosomenfehlverteilungen. Zu den numerischen Aberrationen zählen die Aneuploidien, also das Fehlen (Monosomie) oder zusätzliches Vorhandensein (Trisomie) einzelner Chromosomen. Ist der gesamte Chromosomensatz vermehrt, spricht man von Polyploidie. Sie ist nicht mit dem Leben vereinbar.

In der Meiose, der Zellteilung der Keimzellen, findet zwischen homologen Chromosomen ein Austausch statt. Dieser Austausch von Allelen auf homologen Chromosomen, *crossing over* genannt, dient der genetischen Rekombination und ist verantwortlich für die genetische Heterogenität und die natürliche Selektion in der nächsten Generation (Therman/Susman, 1993). Auch während der Mitose werden Austauschvorgänge beobachtet (Sperling/Neitzel, 2003). Es lassen sich regelmäßig Rekombinationsereignisse zwischen den Schwesterchromatiden eines Chromosoms finden. Bei ungleichem Schwesterchromatidaustausch (*sister chromatid exchange*, SCE) gehen Sequenzen verloren oder verdoppeln sich (Deletion bzw. Duplikation). Nach Mutagenzugabe erhöht sich die SCE-Rate. Das lässt vermuten, dass der Schwesterchromatidaustausch auch bei der DNA-Reparatur eine Rolle spielt.

Neben *crossing over* und SCE treten in der Metaphase auch Chromosomenbrüche auf. Es handelt sich meist um einen Einzelstrangbruch, also um die Unterbrechung der Phosphodiesterbindung zwischen zwei Nukleosiden eines Strangs. Der Bruch kann physiologisch durch die Topoisomerase induziert sein, kann aber auch Folge radioaktiver Strahlung, chemischer Mutagen- und Radiomimetikaeinwirkung sein. Je nach Zellzyklusphase in der die Schädigung stattfindet bzw. das schädigende Agens wirkt, treten Chromosomenbrüche (G1-Phase) oder Chromatidbrüche (S- und G2-Phase) auf. Physikalisch ist das abgebrochene Chromatidfragment noch mit der Chromatide durch chromosomale Proteine verbunden. In der folgenden Synthesephase wird der Chromatidbruch dann auf die Schwesterchromatide übertragen: ein Chromosomenbruch ist entstanden. Ein Chromatidbruch kann auch zur Deletion an dieser Chromatide führen, wenn das azentrische Fragment bei der nächsten Mitose verloren geht. In der folgenden Synthesephase wird die Chromatide mit der Deletion repliziert, dann liegt ein deletiertes Chromosom vor. (Sperling/Neitzel, 2003).

Gleichzeitig auftretende Brüche auf verschiedenen Chromosomen können zu Translokationen führen. Das Chromosomende, Telomer genannt, verhindert ein spontanes Verbinden der Chromosomen untereinander. Wenn die Telomerregion beschädigt oder abgebrochen ist, wird die Fusion unterschiedlicher Chromosomen miteinander möglich. Eine Sonderform der Fusion ist die Robertson-Translokation; die Fusion zweier akrozentrischer Chromosomen. Ihre Folge ist eine besonders hohe Mutationsrate der beteiligten Gene. Die Fusionsstelle liegt jeweils an den p-Armen der beiden Chromosomen. Bleiben die Zentromere erhalten, spricht man von einem dizentrischen Chromosom. Isochromosomen kommen durch ungleiches *crossing over* und folgender Replikation zwischen homologen Chromatiden zustande. Findet ein *crossing over* in einem Chromosom zwischen gegensätzlich laufenden Sequenzen statt, so entsteht daraus eine Inversion, eine Richtungsumkehr im Chromosom. Die Inversion ist perizentrisch, wenn sie das Zentromer mit einschließt und parazentrisch, wenn sie auf einen Arm beschränkt ist.

Durch reziproke Translokation, also durch den Austausch von Chromosomenabschnitten zwischen zwei oder mehr Chromosomen, entstehen entweder zwei monozentrische Chromosomen oder ein dizentrisches Chromosom und ein akrozentrisches Fragment. Im Gegensatz zur balancierten Translokation ist es bei der unbalancierten zum Verlust eines Genabschnitts gekommen. Zwischen

0,3 und 0,5 % der Bevölkerung haben konstitutionelle balancierte Translokationen oder Inversionen ohne klinische Symptome oder morphologische Auffälligkeiten zu zeigen (Therman/Susman, 1993). Konstitutionell bedeutet, dass die Aberration schon in der Zygote vorliegt und sich somit in allen Zellen des Organismus wieder findet, also auch in den Keimzellen. Da die Keimzellen einen haploiden Chromosomensatz haben, kann es bei der Befruchtung einer Eizelle mit einem translozierten Genabschnitt zur Duplikation oder Deletion des Genabschnitts kommen. Man spricht dann von partieller Trisomie bzw. Monosomie. Zeigen sich bei dem Nachkommen ähnliche Symptome wie bei vollständigen numerischen Aberrationen, bietet die partielle Trisomie die Möglichkeit, die beteiligten Gene auf bestimmten Chromosomenabschnitten genauer zu lokalisieren (Sperling/Neitzel, 2000).

Im Gegensatz zu den konstitutionellen Aberrationen werden spontane somatische Aberrationen zwar auch an die Tochterzellen weitergegeben, zeigen aber nur geringe Effekte auf Grund der kleinen Nachkommenschaft dieser somatischen Zellen und werden nicht vererbt, wenn sie nicht in der Keimbahn vorliegen. Translokationen können die auf den translozierten DNA-Abschnitten liegenden Gene verändern, weil sie in einer anderen genetischen Umgebung liegen oder unvollständig transloziert wurden. Die Proteinfunktion kann davon unbeeinflusst bleiben, sie kann aber auch verloren gehen oder verändert werden (*loss of function, gain of function*).

Die sichere Weitergabe des Erbguts trotz Chromatidbrüchen wird durch ein Brucherkennungs- und Reparatursystem gewährleistet. Die Reparatur läuft mit Hilfe einer Aktivierungskaskade verschiedener Proteine ab. Die Replikation stellt einen wichtigen Punkt im Zellzyklus dar, an dem Brüche erkannt werden und durch homologe Rekombination und andere Mechanismen beseitigt werden. Replikationsunabhängig arbeiten *end joining factors*, die gebrochene DNA-Enden so prozessieren, dass sie wieder Phosphodiesterbindungen ausbilden können. Die entstandenen DNA-Strangdefekte werden mit Nukleotiden geschlossen, die DNA-Ligase stellt die Phosphodiesterbindung wieder her (Caldecott, 2004).

Aus einer Mutation in einem Gen, das ein Reparaturprotein kodiert, kann eine chromosomale Instabilität resultieren, da die entstehenden Brüche nicht oder nur unvollständig repariert werden. Krankheiten, denen eine solche Mutation zugrunde liegt, werden als Chromosomeninstabilitätssyndrome bezeichnet. Neben der chromosomalen Instabilität zeichnen sich die Krankheiten durch eine erhöhte Strahlensensibilität (z.B. bei der Ataxia teleangiectasia und beim Nijmegen-

Breakage-Syndrom) und durch ein erhöhtes Krebsrisiko (z.B. beim Bloom-Syndrom und bei der Fanconi-Anämie) aus (Sperling/Neitzel, 2003). Abhängig von dem mutierten Gen sind die Instabilitätssyndrome in der Symptomatik unterschiedlich gewichtet. Bei der Ataxia teleangiectasia sind die Nervenzellen des Kleinhirns besonders von der mangelnden DNA-Reparatur betroffen und werden vermehrt in die Apoptose geführt. Die Neurodegeneration äußert sich dabei namensgebend in einer zerebellaren Ataxie. Die Genmutation verhindert die Erkennung von Doppelstrangbrüchen in den Zellen, man findet in der zytogenetischen Untersuchung deshalb eine erhöhte spontane und induzierte Bruchrate. Das Nijmegen-Breakage-Syndrom stellt sich mit ähnlichen Symptomen und Mikrozephalie dar.

Bei anderen Krankheiten ist die Funktion der Proteine verändert, die modifizierte Basen aus der DNA herausschneiden. Zu diesen Krankheiten zählt die Xeroderma pigmentosum, hier reagiert der Organismus vor allem mit einer diffusen Neurodegeneration in Form von Mikrozephalie (Rolig/McKinnon, 2000). Caldecott hat zwei Erkrankungen beschrieben, die auf Genmutationen von replikationsunabhängigen Reparaturproteinen zurückzuführen sind, im Nervensystem symptomatisch werden und zu einer Neurodegeneration führen (Caldecott, 2004). Diese Erkrankungen, die spinozerebelläre Ataxie mit axonaler Neuropathie (SCAN1) und die Ataxie mit okular-motorischer Apraxia (AOA1), zeigen weder eine chromosomale Instabilität noch ein erhöhtes Krebsrisiko.

Nervenzellen sind postmitotische Zellen, bei ihnen entfällt die Replikation als weitere Kontrollstation. Die Reparaturmöglichkeiten sind somit in den Nervenzellen vermindert (Caldecott, 2004). Mangelnde Kontrollmechanismen und damit vermehrte DNA-Schäden gefährden die Zelle. Als Schutz davor wird über die Aktivierung von p53 der programmierte Zelltod eingeleitet.

Bei den ALS-Patienten, die SOD-1-Mutationen aufweisen, kommt es zu einem Anstieg freier Radikale in den Neuronen. Diese schädigen Proteine und Lipide sowie die DNA, infolgedessen es zur Zelldegeneration kommt (Wong et al., 1995). Der Verdacht einer ursächlichen DNA-Schädigung gab Anlass zu zytogenetischen Untersuchungen bei Patienten mit sporadischer ALS.

Ein Patient mit ALS kombiniert mit einer früh beginnenden Demenz lieferte einen zytogenetischen Zufallsbefund mit einer konstitutionellen Translokation t(18;21)(q23;q22) (Prudlo, 2004). Um auszuschließen, ob die Kombination mit der

Frontotemporalen Demenz Ursache für zytogenetische Auffälligkeiten ist, untersuchte Meyer auch Patienten mit der klassischen sALS. Unter 85 sALS-Patienten fanden sich weitere vier Patienten mit einer konstitutionellen Translokation zwischen unterschiedlichen Chromosomen. Allerdings zeigten asymptotische Familienmitglieder in drei Patientenfamilien die gleichen konstitutionellen Translokationen bzw. Inversionen wie die Patienten (Meyer, 2003).

Die Tatsache, dass unterschiedliche strukturelle Veränderungen zu beobachten sind, auch bei neurologisch unauffälligen Personen, lässt vermuten, dass die Veränderungen genomische Risikofaktoren für den Ausbruch der ALS darstellen, nicht aber die alleinige Ursache sind. Der pathogenetische Zusammenhang zwischen den Chromosomenaberrationen und der ALS ist bisher nicht bekannt. Ein möglicher Schädigungsmechanismus könnte durch die Unterbrechung der Gene an den Bruchpunkten bedingt sein. Auf der Suche nach weiteren konstitutionellen chromosomalen Veränderungen zeichnete sich bei den untersuchten Patienten der ALS-Ambulanz des Universitätsklinikums

Tabelle 2: Karyogramm einer sALS-Patientin.

Zellzahl	Chromosomenzahl	Karyotyp
12	46	46,XX
1	45	Chromosomenverlust
1	46	46,XX inv (7q), -13, +der(13), t(13;22)(q34;q11.2), del(14)(q24), +ace, inv(14)(q24-qter), -22.
1	45	45,X
1	47	47,XXX, del(11)(q11)

Ähnliche zytogenetische Befunde wurden bei weiteren sALS-Patienten gefunden. Das Entstehen einer erhöhten Frequenz von Chromosomenaberrationen kann in einem bisher unbekannten Mechanismus begründet sein, der eine chronische Degeneration motorischer Nervenzellen begünstigt und zugleich zu einer chromosomalen Instabilität führt. Diese Hypothese wird durch die Einzelbefunde von ALS-Patienten mit erhöhten somatischen Aberrationen unterstützt und wird in der vorliegenden Arbeit mit unterschiedlichen Methoden untersucht.

1.3 Fragestellung

Da Migliore (2002) bei einer weiteren neurodegenerativen Systematrophie, dem Morbus Parkinson, oxidative DNA-Schäden auch in Leukozyten und nicht nur in den betroffenen Zellen der *Substantia nigra* nachweisen konnte, wirft sich die Frage auf, ob man auch bei ALS-Patienten zytogenetische Auffälligkeiten in Lymphozyten des Blutes feststellen kann (Migliore et al., 2002). Lymphozyten lassen sich durch eine Blutentnahme einfach gewinnen und gut kultivieren. Oxidativ oder exogen verursachte DNA-Schäden können zytogenetisch durch strukturelle Aberrationen sichtbar gemacht werden.

Folgende Methoden sollen eingesetzt werden, um Lymphozyten von ALS-Patienten auf strukturelle Chromosomenaberrationen zu untersuchen: Mittels GTG-Bänderung (G-Banden nach Trypsinierung und Giemsa) sollen die Patienten karyotypisiert und die Chromosomen analysiert werden. Eine Chromosomenanalyse kann Translokationen, Inversionen, Duplikationen, Deletionen und numerische Aberrationen sichtbar machen. Ein erhöhter Schwesterchromatidaustausch (SCE-Rate) kann, wie bei Patienten mit dem Bloom-Syndrom, mit chromosomaler Instabilität assoziiert sein (Sperling/Neitzel, 2003), deshalb sollen auch bei den in dieser Arbeit untersuchten ALS-Patienten die SCE-Raten bestimmt werden. Die Chromatid- und Chromosomenbruchraten werden in einem Bruchversuch mit Bleomycin bestimmt. Bei diesem Versuch soll neben der spontanen Bruchrate auch die Bleomycin induzierte Bruchrate ermittelt werden. Bleomycin ist ein Zytostatikum aus der Gruppe der Antibiotika, das in die DNA interkaliert und damit Einzelstrang- und Doppelstrangbrüche verursacht. In Abhängigkeit von der Empfindlichkeit der DNA und der Aktivität und Effektivität des Kontroll- und Reparatursystems sind die Chromosomenbruchraten entsprechend hoch. Balancierte reziproke Translokationen, mit die häufigsten strukturellen Chromosomenaberrationen, lassen sich sehr effektiv und objektiv mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) nachweisen. Dabei wird die zu untersuchende DNA mit einer komplementären, fluoreszenzmarkierten DNA hybridisiert. Die Ziel-DNA paart sich mit der Sonden-DNA, sodass nun die zu untersuchenden Sequenzen unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar werden. Hybridisiert man ganze Chromosomen mit fluoreszenzmarkierten Sonden, so werden Translokationen zwischen den Chromosomen durch einen Farbwechsel im

Chromosom sichtbar. Auf diese Weise soll die spontane Translokationsrate von ALS-Patienten untersucht werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, mittels verschiedener zytogenetischer Untersuchungen somatische Chromsomenaberrationen und ihre Häufigkeit in Lymphozyten von sALS-Patienten zu bestimmen. Diese Analysen werden in einer Fall-Kontroll-Studie durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten, Verwandte und Kontrollpersonen

Das verwendete Blutmaterial stammt von ALS-Patienten mit einer gesicherten Diagnose ALS (Brooks, 1994). Diese Patienten befanden sich in der ALS-Ambulanz in Betreuung und waren mit der Untersuchung einverstanden. Die unterzeichneten Einverständniserklärungen der Patienten, Verwandten und Kontrollpersonen liegen vor. Ebenso liegt ein positives Votum der Ethikkommission der Charité vor. Die Patienten waren bei Beginn der Untersuchung zwischen 37 und 81 Jahre alt, im Durchschnitt 64 Jahre. Von den 45 Patienten litten zwei an fALS, in vier Fällen wurde die ALS von der Frontotemporalen Demenz begleitet. Ein Patient hatte eine progressive Bulbärparalyse, bei einem anderen bestand der Verdacht auf eine spinale Muskelatrophie, drei weitere hatten andere Sonderformen der ALS. In der folgenden Tabelle sind alle Patienten aufgeführt.

Tabelle 3: Patientendaten: Fall-Nr. zur Anonymisierung, Geschlecht (w/m), Geburtsjahr (GJ), Lebensalter bei Krankheitsbeginn (KB), Lebensalter bei Untersuchung (U), Art der Erkrankung (Art), Nebendiagnosen/Besonderheiten (N/B), frontotemporale Demenz (FTD), primäre Muskelatrophie (PMA), spinale Muskelatrophie (SMA).

Fall-Nr.	w/m	GJ	KB	U	Art	N/B
jw001	w	1928	71	74	ALS	FTD
jw005	w	1934	65	68	ALS	
jw007	m	1931	62	71	ALS	monoklonale Gammopathie
jw011	m	1952	50	50	ALS	
jw013	m	1937	56	65	ALS	
jw016	w	1940	61	62	ALS	
jw018	w	1939	61	63	ALS	
jw020	m	1922	68	80	ALS	

Fall-Nr.	w/m	GJ	KB	U	Art	N/B
jw021	m	1936	64	65	ALS	
jw024	w	1956	37	46	ALS	
03P0936	m	1957	45	47	ALS	
03P0938	m	1951	44	52	ALS	
03P0942	m	1925	68	78	ALS	
03P0943	m	1935	68	68	ALS	
03P0944	m	1946	56	58	ALS	
03P0976	w	1961	38	39	ALS	
03P0977	w	1942	58	62	ALS	
03P0978	m	1936	67	68	fALS	SOD1-Genmutation
03P1003	m	1967	35	37	ALS	
03P1004	w	1933	70	71	ALS	
03P1005	m	1934	63	70	ALS	
03P1006	m	1938	61	66	ALS	
03P1008	w	1930	73	74	ALS	
03P1031	m	1944	59	60	ALS	
03P1033	m	1936	65	68	fALS	FTD
04P0009	m	1942	61	62	ALS	FTD
04P0010	w	1931	72	73	ALS	monoklonale Gammopathie
04P0011	w	1935	68	69	ALS	
04P0022	m	1923	79	81	PMA	
04P0023	w	1937	65	66	ALS	
04P0024	m	1943	60	61	ALS	
04P0025	m	1967	34	37	SMA	V.a. distale SMA
04P0044	w	1938	65	66	ALS	
04P0045	m	1935	63	68	ALS	Bernhardt-Vulpian-Variante
04P0046	w	1937	58	67	ALS	Bernhardt-Vulpian-Variante
04P0080	m	1936	65	68	ALS	
04P0081	w	1940	62	64	ALS	
04P0124	m	1945	51	59	SMA	V.a. radiogene Plexopathie des Plexus lumbosacralis

Fall-Nr.	w/m	GJ	KB	U	Art	N/B
04P0125	m	1935	68	69	ALS	
04P0126	w	1928	75	76	ALS	
04P0144	m	1930	72	74	ALS	progrediente Bulbärparalyse
04P0145	m	1946	57	58	ALS	FTD
04P0166	w	1930	72	74	ALS	
04P0182	w	1944	59	60	ALS	
04P0183	w	1934	69	70	ALS	
Mittelwert			60,9	64,1		

Tabelle 4: Probanden, die sich als Kontrollpersonen zur Verfügung stellten. Fall-Nr. zur Anonymisierung, Geschlecht (w/m), Geburtsjahr (GJ), Lebensalter bei Untersuchung (U).

Fall-Nr.	w/m	GJ	U
jw003	m	1954	48
jw006	m	1934	68
jw010	w	1937	65
jw012	w	1960	42
jw015	w	1939	63
jw030	w	1952	50
jw026	m	1976	26
jw025	w	1980	22
03P0935	w	1960	44
03P0937	w	1952	52
03P0939	w	1937	67
03P0941	w	1959	45
03P1007	w	1969	45
03P1009	w	1954	50
03P1010	w	1980	24
03P1032	w	1937	67
04P0012	m	1947	57

Fall-Nr.	w/m	GJ	U
04P0082	m	1936	68
04P0391	m	1966	38
04P0392	w	1978	26
04P0393	w	1979	25
04P0394	w	1976	28
04P0395	w	1971	33
04P0396	m	1978	26
04P0390	m	1977	27
04P0402	w	1979	25
04P0432	w	1968	36
04P0433	m	1969	35
04P0434	m	1981	23
04P0485	w	1957	47
04P0486	m	1951	53
04P0487	w	1954	50
04P0488	w	1975	29
04P0489	m	1932	72
04P0490	w	1954	50
04P0491	m	1957	47
04P0492	m	1966	38
04P0493	m	1957	47
04P0494	m	1943	61
04P0495	w	1960	44
04P0496	m	1944	60
04P0267	w	1942	62
Mittelwert			44,9

Tabelle 5: Verwandte, die sich für die Untersuchung zur Verfügung stellten: Fall-Nr. zur Anonymisierung, Geschlecht (w/m), Verwandtschaftsgrad (Grad), Geburtsjahr (GJ), Lebensalter bei Untersuchung (U).

Fall-Nr.	m/w	Grad	GJ	U
jw002	w	Tochter	1956	46
jw004	w	Tochter	1971	31
jw009	w	Tochter	1962	40
jw008	w	Halbschwester	1928	84
jw014	m	Sohn	1962	40
jw017	w	Tochter	1959	43
jw019	w	Tochter	1969	33
jw022	m	Bruder	1940	62
jw023	w	Tochter	1968	34
Mittelwert				45,6

2.2 Geräte

Tabelle 6: Die für alle Untersuchungen verwendeten Geräte, alphabetisch.

Gerät	Hersteller
7,5 ml Monovette, heparinisiert	Monovette, Sarstedt
Brutschrank, 37 °C, 5 % CO ₂	Heraeus B15, Kendro Laboratory Products, Hanau
Deckgläser, 24x60 mm	Menzel-Gläser
Einmalglaspipetten, Pasteurpipetten, Glaspipetten	Brand
Falconflaschen	Becton Dickinson, USA
Färbeküvetten	Glaswerk, Wertheim
Fluoreszenz-Filter	Zeiss, Jena
Durch-und Auflichtmikroskop, 10/40/63/100 Objektiv, Axioskop	Zeiss, Jena
Multiadapter	Sarstedt, Nürnberg

Gerät	Hersteller
Objektträger, Superfrost	Menzel-Gläser
Quecksilberdampf Lampe	mercury short arc photo lamp optic 1xHBO 103W/2, orsam, Berlin
Schnappdeckelröhrchen (round bottom tube)	Becton Dickinson, USA
Schwarzlichtlampe	Philips 20W/08F20T 12BLB
Trockenschrank, 60 °C, 5 % CO ₂	Melag
Venenpunktionsbesteck W.I.N. 21 g	Abbot Ireland
Wärmeplatte, 45 °C	Medax Nagel GmbH, Kiel
Wasserbad, 37 °C, 73 °C und 80 °C	GFL1083, Burgwedel
Zentrifuge, Megafuge 2.0	Heraeus Sepatech

2.3 Chemikalien

Tabelle 7: Die für alle Untersuchungen verwendeten Chemikalien, alphabetisch.

Chemikalien	Zusammensetzung	Hersteller
0,4 x SSC/0,3 % Igepal	10 ml 20 x SSC ad 500ml aqua bidest./1,5 µl Igepal (Igepal CA-630)	Merck, Darmstadt SIGMA- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
20 x SSC	175,3 g NaCl, 88,2 g tri- Natriumcitrat-Dihydrat ad 1000 ml aqua bidest.	Merck, Darmstadt
2 x SSC	Verdünnung 1:10 von 20 x SSC mit Aqua dest.	Merck, Darmstadt
2 x SSC/0,1 % Igepal	50 ml 20 x SSC ad 500 ml aqua bidest. 0,5 µl Igepal	Merck, Darmstadt, SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
70 % Formamid/2 x SSC	24,5 ml Formamid, 3,5 ml 20 x SSC, 7 ml aqua bidest. autoklaviert. 17 µl 37 % HCl (pH 7,0)	Merck, Darmstadt
aqua bidestillata		nalgene

Chemikalien	Zusammensetzung	Hersteller
aqua destillata	Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen
Bleomycin Stammlösung 5 mg/ml	Bleomycinsulfat rein (biol. Aktivität: 1,4-2,1 U/mg)	SERVA electrophoresis, Heidelberg
Blutkulturmedium	100 ml RPMI 1640 Medium+GlutaMAX. 20 ml fetal bovine serum (tested for Mycoplasma). 2,5 ml PHA-L (Phytohemagglutinin). 1,2 mg Protein/5 ml. 1 ml Penicillin/ Streptomycin (10000 U/10000 µg/ml)	GIBCO, Auckland N.Z. BIOCHROM KG, Berlin
Bromodesoxyuridin, 10 mM	5-Bromo-2'-Deoxyuridine Ultra 99 % 15,35 mg/50 ml aqua dest.	SIGMA-AldrichChemie GmbH, Steinheim
Colcemid	10 µg/ml KaryoMAX Colcemid	GIBCO, Auckland N.Z.
Dapi 0,5µg/ml	150 µl stock 200 µg/ml 12 ml 20 x SSC 48 ml aqua bidest. 150 µl Tween20	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Eindeckmittel	Vitro-Clud	R.Langenbrinck, Emmendingen
Ethanol 100 Vol.-%	Ethanol 100 Vol.-% denaturiert mit MEK (Ethylmethyleketon)	Herbeta-Arzneimittel, Berlin
Ethanol 70 Vol.-%	70ml Ethanol 100 Vol.-% ad 100 ml aqua bidest.	Herbeta-Arzneimittel, Berlin
Ethanol 85 Vol.-%	85 ml Ethanol 100 Vol.-% ad 100 ml aqua bidest.	Herbeta-Arzneimittel, Berlin
Fixativ	25 ml Essigsäure (Eisessig), 100 % wasserfrei, 75 ml Methanol, „baker analyzed“	Merck, Darmstadt J.T. Baker, Deventer, Holland
Fixierungsleim	Fixogum	marabuwerte GmbH&Co.KG, Tamm
Giemsa-Färbung (Azur-Eosin-Methylenblau)	6 ml Giemsa-Hollborn-Original-Stammlösung (0,5 ml zu 10 ml Aqua dest.)	Dr.K.Hollborn&Söhne, Leipzig Merck, Darmstadt

Chemikalien	Zusammensetzung	Hersteller
	70 ml Phosphatpuffer (0,025 M, pH 6,88)	
Hoechst 33258 Gebrauchslösung	1 ml Hoechst 100 µg/ml Stammlösung (10 mg Bisbenzimidazole H 33258 ad 100 ml aqua dest.) 75 ml aqua dest	SERVA electrophoresis, Heidelberg
Hybridisierungsgel	Hybrisol VI	oncor, Gaithersburg
KCl-Lösung, 0,4 %ig		Merck, Darmstadt
NaCl-Lösung (0,9 %ig)		Merck, Darmstadt
PBS Puffer	PBS dulbecco w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	BIOCHROM AG, Berlin
Total Chromosome DNA, Chr3/red, Chr5/red, Chr7/green		Qbiogene
Trypsin	5 ml Trypsin, 2,5 % 15 ml NaCl	GIBCO, Auckland, N.Z. Merck, Darmstadt
Vectashield Antifading	Vectashield mounting medium for fluorescence	Vector Laboratories, Burlingame

2.4 Lymphozytenkultur, Aufarbeitung und GTG-Bänderung

Mittels Venenpunktionsbesteck wird aus einer oberflächlichen Armvene 5 ml Vollblut in eine heparinisierte Monovette entnommen. Für den Blutkulturansatz werden 5 ml Blutkulturmedium und 0,3 ml heparinisiertes Vollblut in eine Falconflasche pipettiert und bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank 72 h kultiviert. Durch die Zugabe von Colcemid 1,5 h vor der Aufarbeitung werden die Zellen in der Metaphase der Mitose arretiert. Colcemid inaktiviert die Spindelfasern, die Aufteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen wird so verhindert. Nach 72 h wird die Kultur bei 1000 U/min 10 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen in 5 ml hypotoner Kochsalzlösung (KCl) bei 37 °C 10 min zum Anschwellen gebracht, um die Chromosomenspreitung zu verbessern. Nach 10-minütigem Zentrifugieren bei 1000 U/min wird der Überstand abgenommen und verworfen. Die nachfolgende Fixierung mit 5 ml Fixativ hat die Aufgabe, das Gewebe zu konservieren und den Verlust von Nukleinsäure zu verhindern. Durch die Denaturierung wird die Aktivität endogener Nukleasen und anderer gewebsabbauender Enzyme gering gehalten. Die Zellmembran wird elastisch fixiert. Das aus den Erythrozyten freigesetzte

Hämoglobin wird auch denaturiert, zu erkennen an dem Farbumschlag in der Suspension von rot zu braun (www.uni-kl.de/FB-Biologie/AG-Zankl/chrab.html). Die Suspension wird für 10 min bei 1000 U/min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und verworfen. Fixativzugabe und Zentrifugieren werden zweimal wiederholt. Die Suspension ist nun milchig weiß und kann aufgetropft werden.

Ein Tropfen der Suspension wird mit 20-30 cm Abstand auf den gekühlten und mit 80 % Ethanol gereinigten Objektträger gegeben und unter einer Wärmelampe getrocknet. Nach erster Beurteilung unter dem Phasenmikroskop werden die Nucleohistonproteine der Chromosomen mit Trypsin denaturiert. Die Bindung der Giemsa-Färbung ist abhängig von der Verteilung der Nucleohistonproteine auf dem Chromosom. So werden Areale mit wenigen Proteinen schwächer gefärbt als solche mit vielen. Die Behandlung mit Trypsin für die GTG-Bänderung dauert 35-45 s. Der Objektträger wird nun 10 s unter fließendem Leitungswasser abgespült und die Chromosomen werden 6-8 min mit 2 %iger Giemsa-Lösung gefärbt. Das Präparat wird mit destilliertem Wasser abgespült und getrocknet. Ist die Färbung ausreichend, wird der Objektträger mit einem Deckglas eingedeckt.

2.5 SCE-Färbung

Die Kultivierung und Aufarbeitung entspricht der Normalpräparation, allerdings wird dem Blutkulturansatz 250 µl 10mM Bromodesoxyuridin (BrdU) zugegeben. BrdU ist ein Thymidinbasenanalogon und wird in der Synthesephase in die DNA eingebaut. Im neu synthetisierten Tochterstrang ist Thymidin nun durch BrdU substituiert. Kommt es während der Kultivierung zu einem zweiten Zellzyklus, so wird BrdU nun auch in den anderen Tochterstrang eingebaut, das Chromatid ist bifilar mit BrdU substituiert. Das andere Chromatid ist immer noch unifilar substituiert, denn es enthält den Matrizenstrang, in den noch kein BrdU eingebaut wurde. Nach der zweiten Synthesephase besteht also ein Chromosom aus einem uni- und einem bifilar substituierten Chromatid. Die aufgetropfte Zellsuspension wird nach der Aufarbeitung des Blutkulturansatzes mit Hoechst 33258 Gebrauchslösung 15-20 min gefärbt. Der Objektträger wird mit aqua dest. abgespült und mit 3-5 Tropfen PBS Puffer und einem Deckglas versehen. So wird er 10 min auf eine Wärmeplatte (60 °C) gelegt und mit einem Abstand von 15 cm mit einer Schwarzlichtlampe bestrahlt. Das Schwarzlicht photolysiert die DNA, die mit BrdU substituiert wurde. Die photolysierte DNA wird abgebaut und mit dem warmen Puffer abgewaschen. Nach dieser Behandlung wird das Deckglas mit aqua dest. abgespült und das Präparat 4 min in einer 2 %igen Giemsalösung gefärbt. Das bifilar substituierte Schwesterchromatid wird nun nicht so stark mit Giemsa gefärbt, weil es durch die Degradierung weniger DNA und färbbare Proteine hat als das nur unifilar substituierte Chromatid. Die Färbung mit Hoechst scheint die Giemsafärbung positiv zu beeinflussen. Sie wird deshalb beibehalten, obwohl die Präparate am normalen Lichtmikroskop und nicht am Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden (www.uni-kl.de/FB-Biologie/AG-Zankl/chrab.html).

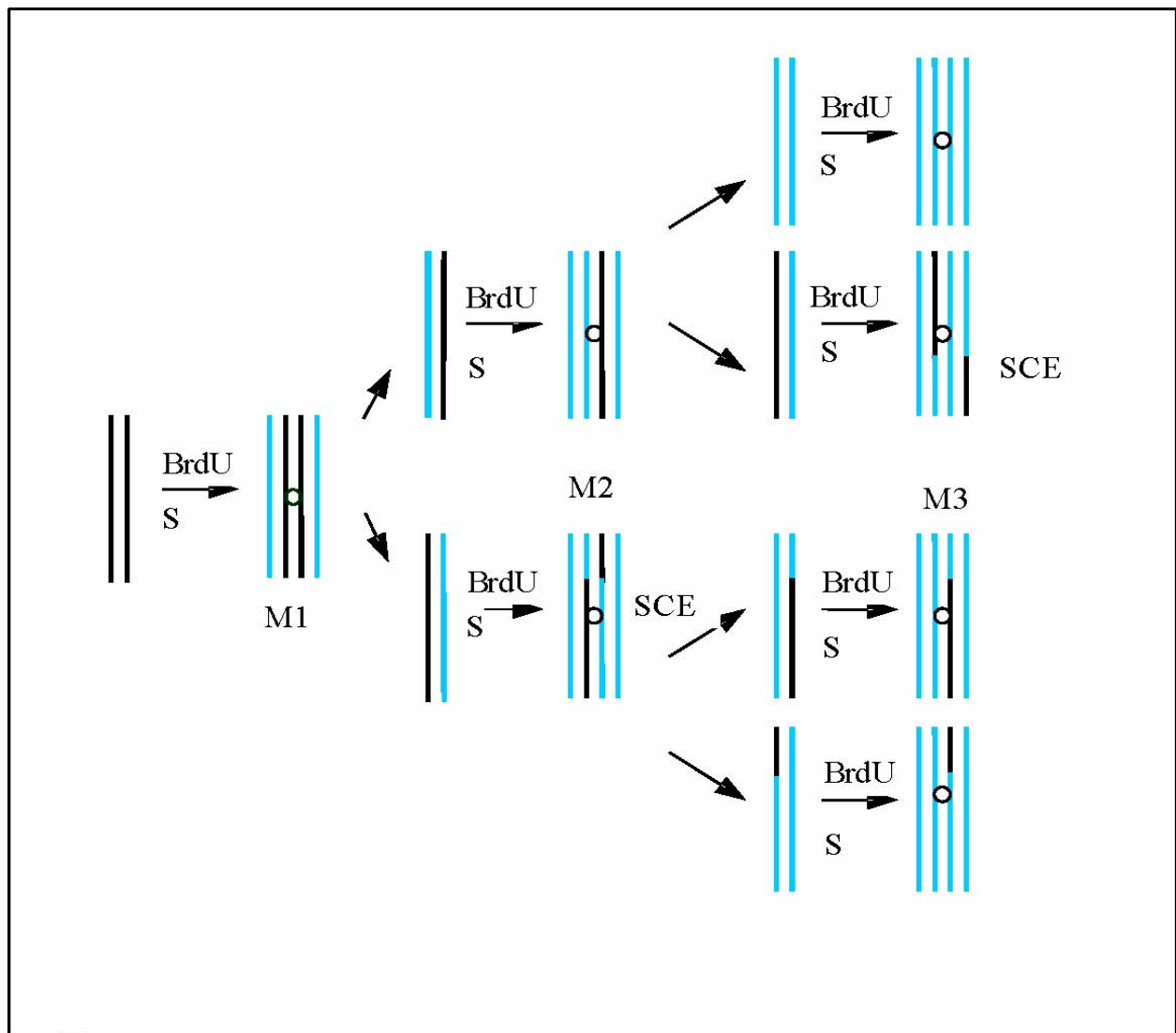


Abbildung 2: Einbau von BrdU in der S-Phase (S), Färbeverhalten der Chromatide in den folgenden Mitosen (M1-M3); substituiertes Einzelstrang in grau.

2.6 Induzierte Chromosomenbruchrate nach Bleomycinbehandlung

Die Kultivierung erfolgt wie bei der Normalpräparation. Man setzt von jeder Blutprobe drei Blutkulturen mit je 0,3 ml Vollblut und 5 ml Blutkulturmedium an. Nach 68 h Kultivierung wird das Medium gewechselt. Das neue Medium ist mit Bleomycin in verschiedenen Konzentrationen versetzt. Der erste Blutkulturansatz dient als Leerwert, da in diesem Medium kein Bleomycin enthalten ist. Im zweiten sind 1 µg/ml Bleomycin und im dritten 10 µg/ml Bleomycin enthalten. Die zytostatische Behandlung mit Bleomycin wird 2 h im Brutschrank bei 37 °C durchgeführt, nach der Zugabe von 25-30 µl Colcemid für weitere 2 h fortgeführt. Danach erfolgt die Aufarbeitung wie bei der Normalpräparation. Da Bleomycin ein Zytostatikum ist, muss bei der Aufarbeitung mit einer Atemschutzmaske gearbeitet werden. Sind die Chromosomen auf den Objektträgern, werden sie ohne vorherige Trypsinierung für 15 Minuten in 2 %iger Giemsa-Färbelösung gefärbt. Die Chromosomen lassen sich nun unter dem Lichtmikroskop bei 1000facher Vergrößerung gut erkennen. Chromatid- und Chromosomenbrüche stellen sich in der Diskontinuität der Färbung dar. Ist die Färbelücke schmaler als der Durchmesser des Chromatids, spricht man von einem *chromatidgap*. Diese Diskontinuität wird nicht als Bruch gewertet, weil nicht auszuschließen ist, dass es sich dabei lediglich um einen Färbeartefakt handelt.

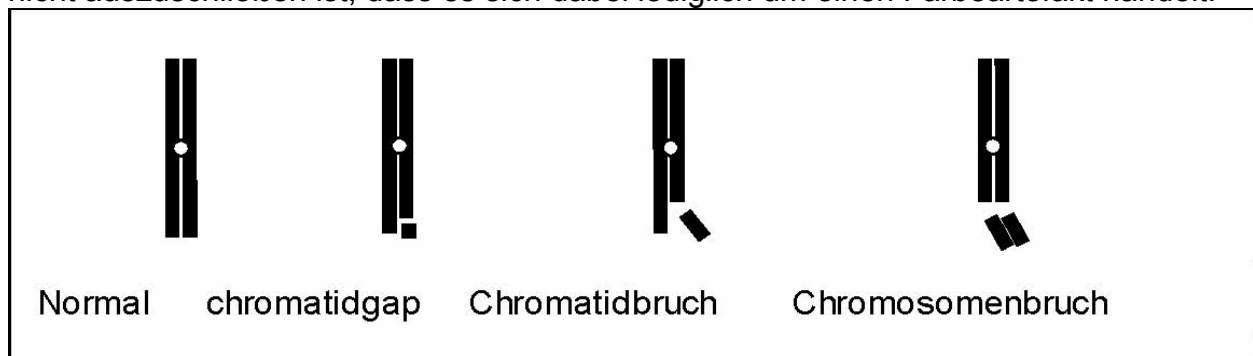


Abbildung 3: Definition von *chromatidgaps*, Chromatidbrüchen und Chromosomenbrüchen

2.7 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Die Kultivierung und Aufarbeitung erfolgt wie bei der Normalpräparation. Nach der Aufarbeitung muss das Präparat über Nacht trocknen. Ist das Präparat schon älter als einen Tag, so wird es vor der Hybridisierung 30 min in 2 x SSC inkubiert, um die Denaturierung und Hybridisierung zu verbessern. Die ungefärbten Chromosomen werden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 85 % und 100 % Ethanol) jeweils 2 min dehydriert und anschließend in 70 % Formamid/2 x SSC im Wasserbad (73 °C) denaturiert. Bei der Denaturierung wird die doppelsträngige DNA in zwei Einzelstränge getrennt, weil die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nukleinsäurebasen der hohen Temperatur nicht standhalten können. Adenin bildet mit Thymin zwei Wasserstoffbrückenbindungen aus, während Guanin mit Cytosin drei Wasserstoffbrückenbindungen ausbildet. Der Objektträger wird kurz in 2 x SSC gewaschen und erneut durch die Alkoholreihe geführt. Bei der Hybridisierung macht man sich zu Nutze, dass denaturierte Einzelstränge wieder mit dem Einzelstrang, der die komplementäre Nukleinsäureabfolge hat, renaturieren bzw. hybridisieren. Es entsteht so ein neuer Doppelstrang der aus einem Einzelstrang mit Sonden-DNA und einem Einzelstrang mit der Ziel-DNA besteht. Bei der Hybridisierung wählt man eine Temperatur unterhalb des Schmelzpunktes der Doppelhelix. Dieser Temperatur können falsch gepaarte Sequenzen auf Grund ihrer schwachen Bindungskräfte nicht standhalten, die Bindungen zwischen richtig gepaarten Sequenzen bleiben stabil. Diese Prozesse nennt man *annealing* (Therman/Susman, 1993).

In der vorliegenden Untersuchung werden Sonden der Chromosomen 3, 5 und 7, die mit rotem bzw. grünem Fluoreszenzfarbstoff direkt markiert waren, eingesetzt. Pro Objektträger werden 4 µl Sonden der Chromosomen 3, 5 und 7 und 13 µl Hybrisol VI gemischt und bei 73 °C im Wasserbad 5 min denaturiert. Die denaturierte Sonde wird auf den Objektträger pipettiert, auf dem sich schon die denaturierte DNA befindet. Mit einem Deckglas und Fixogum wird der Objektträger versiegelt und bei 37 °C über Nacht inkubiert. In dieser Zeit findet die Hybridisierung statt. Die Entfernung der nicht spezifisch gebundenen Sonden erfolgt am nächsten Tag durch Waschen mit 0,4 x SSC/0,3 % Igepal bei 73 °C für 2 min und anschließend für 30 s mit 2 x SSC/0,1 % Igepal bei Raumtemperatur. Danach werden die Chromosomen mit DAPI-Lösung 14 min unter Lichtausschluss gefärbt, mit VE-Wasser (vollentsalztes Wasser, entspricht Aqua demineralisata) gewaschen und mit Vectashield Antifading eingedeckt.

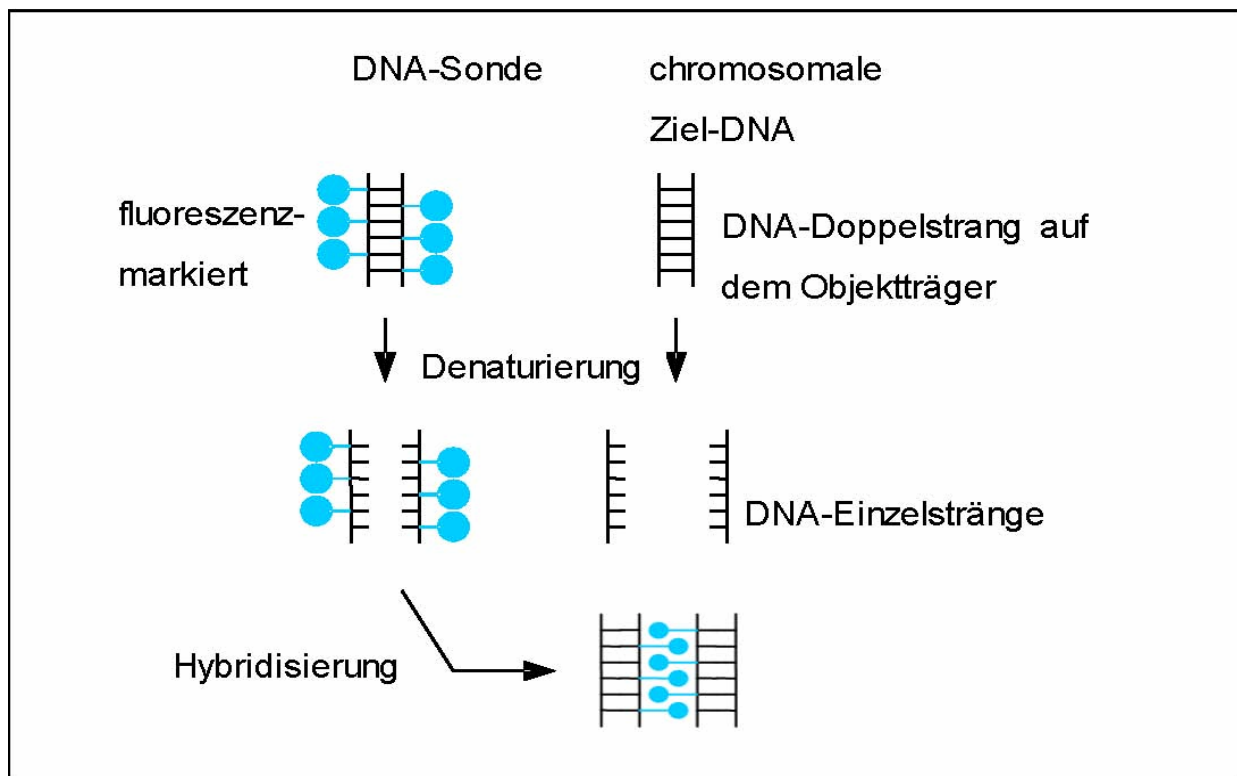


Abbildung 4: Denaturierung und Hybridisierung der Sonden- und Ziel-DNA

Das Präparat wird an einem Fluoreszenzmikroskop mit der Quecksilberdampflampe und dem DAPI-Filter (4',6-Diamidin-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid) ausgewertet. Die verwendeten Objektive bieten eine 400fache bzw. 630fache Vergrößerung. Unter dem DAPI-Filter kann die Vollständigkeit der Mitosen beurteilt werden. Mit dem TRITC-Filter (Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat) sind die Chromosomen 3 und 5 rot und mit dem FITC-Filter (Fluorescein-5-Isothiocyanat) die Chromosomen 7 grün sichtbar. Die Chromosomen 3 und 5 sind trotz gleicher Fluoreszenzfarbe auf Grund ihrer verschiedenen Größe und einer unterschiedlichen Intensität der Färbung voneinander zu unterscheiden. Translokationen zwischen dem hybridisierten Chromosom und einem anderen werden durch einen Farbwechsel im Chromosom sichtbar. Die Hintergrundfärbung ist bei der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung gering. Auffällige Mitosen werden mit der Mikroskopkamera aufgenommen und im ISIS-Programm von Metasystems digitalisiert und gespeichert.

Tabelle 8: Spezifikation der verwendeten Filterkombinationen

Fluoreszenz-farbstoff	DAPI	FITC/Sp. Green	TRITC/Sp. Orange
Filter-Nr.	01	10	15
Anregungslicht	UV	Blau	Grün
Anregungsfilter	365 nm	450-490 nm	546 nm
Farbteiler	395 nm	510 nm	580 nm
Sperrfilter	397 nm	515-555 nm	590 nm
Farbe der Fluoreszenz	Blau	Grün	Rot

Als unauffällig wird eine Metaphase gewertet, wenn vollständig fluoreszierende Chromosomenpaare der Chromosomen 3, 5 und 7 zu sehen sind. Als ein Ereignis wird ein Farbwechsel innerhalb eines Chromosoms von rot bzw. grün zu blau gewertet. Besitzen beide entstandenen Derivatvchromosomen ein Zentromer, so hat eine reziproke Translokation stattgefunden. Ist der Farbwechsel innerhalb eines Chromosoms von rot zu grün erfolgt, so wird dies als zwei Ereignisse gewertet. Als ein Ereignis ist die Beteiligung eines hybridisierten Chromosoms an einer reziproken Translokation zu werten. Mit der Anzahl der gezählten Ereignisse wird die Translokationsfrequenz der Chromosomen 3, 5 und 7 beschrieben. Um eine Aussage über die Translokationsrate des Gesamtgenoms machen zu können, wird ausgehend von den 18,2 % Genomanteil der untersuchten Chromosomen 3, 5 und 7 auf 100 % Gesamtgenom umgerechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Karyotypisierung und Chromosomenanalyse

Bei der Karyotypisierung werden die Chromosomen nicht nur nach ihrer Größe sortiert, sondern auch nach der Lage des Zentromers. So kann man ungebänderte Chromosomen in 7 Gruppen unterteilen:

- A-Gruppe: Chromosomen 1-3
 - B-Gruppe: Chromosomen 4 und 5
 - C-Gruppe: Chromosomen 6-12 und X
 - D-Gruppe: Chromosomen 13-15
 - E-Gruppe: Chromosomen 16-18
 - F-Gruppe: Chromosomen 19 und 20
 - G-Gruppe: Chromosomen 21, 22 und Y
- A-Gruppe-Chromosomen (1-3) sind große meta- und submetazentrische Chromosomen, B-Gruppe-Chromosomen (4, 5) sind groß und submetazentrisch, C-Gruppe-Chromosomen (6-12) sind mittelgroße submetazentrische Chromosomen, unter denen das X-Chromosom das größte ist. Die D-Gruppe besteht aus akrozentrischen Chromosomen mittlerer Größe mit Satelliten (13-15). Es folgen die E-Gruppe-Chromosomen (16-18), die klein und submetazentrisch sind, die F-Gruppe-Chromosomen (19, 20) sind sehr kleine metazentrische Chromosomen. Die G-Gruppe beinhaltet akrozentrische Chromosomen mit Satelliten (21, 22 und Y). Anhand dieser Einteilung lässt sich jedes Chromosom einer Gruppe zuordnen (Mitelman, 1995). Mittels Giemsa, einem spezifischen Farbstoff, der sich an Nucleohistonproteine im Chromosom bindet, kann man die Chromosomen nach vorheriger Trypsinierung in einem für sie spezifischen Muster aus hellen und dunklen Querbanden darstellen. Damit sind die Chromosomen unterscheidbar. Wie stark Giemsa in die DNA eingebaut wird, hängt unter anderem von der Basenzusammensetzung (AT-reiche Regionen werden stärker gefärbt als GC-reiche Regionen), von der Chromatinkonformation, der Dichte an Genen und repetitiven Sequenzen und vom Zeitpunkt der Replikation ab. So werden spät replizierende Abschnitte stärker als früh replizierende Chromosomenabschnitte gefärbt (Barch, 1991). Mit der Bänderung können

strukturelle Aberrationen sehr genau lokalisiert werden, indem man die Chromosomen mit dem „International System for Human Cytogenetic Numenclature“ von 1995 vergleicht.

In den folgenden Abbildungen ist ein weiblicher Chromosomensatz nach GTG-Bänderung als Metaphase und als Karyogramm dargestellt.

Abbildung 5: Metaphase nach GTG-Bänderung.

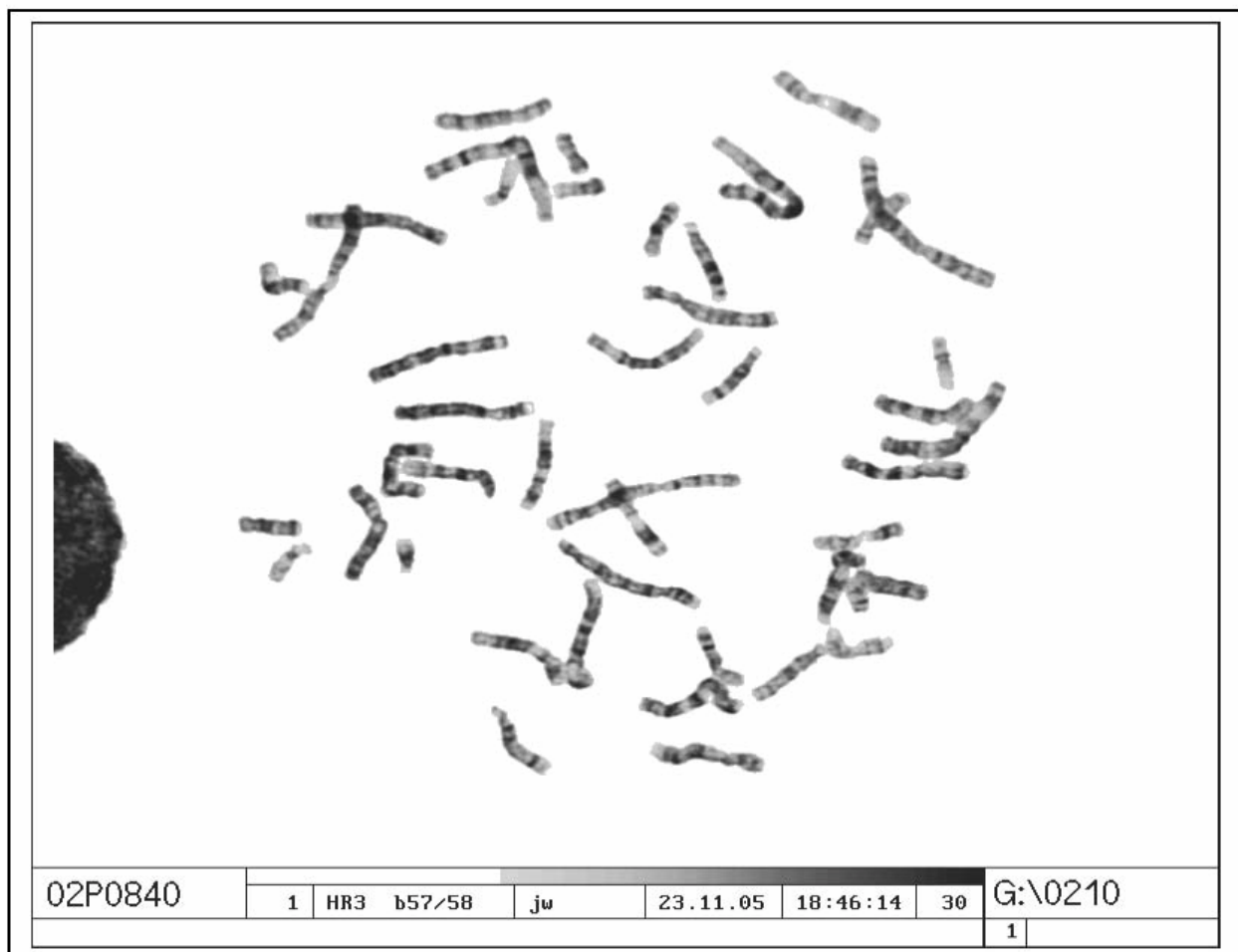


Abbildung 5: Metaphase nach GTG-Bänderung

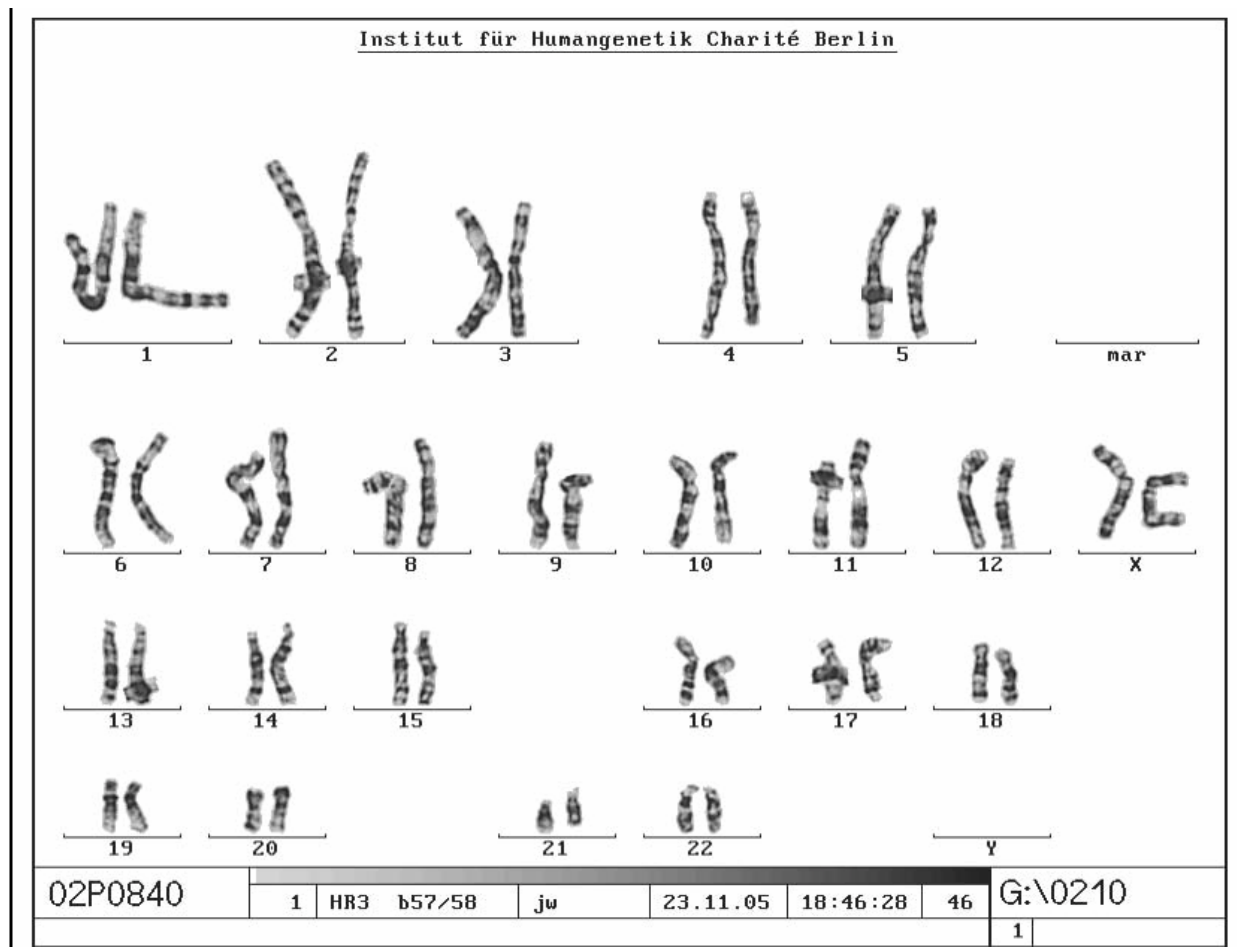


Abbildung 6: Karyogramm eines weiblichen Chromosomensatzes.

Die Kennzeichnung einer Aberration ist genau festgelegt: Chromosomennummer, kurzer oder langer Arm (p bzw. q), Regionnummer und die Bandennummer in dieser Region. Kann man auch eine Aussage über die Unterbande machen, so wird diese durch einen Punkt getrennt anschließend an die Bandennummer aufgeführt. Die Regionen sind ausgehend vom Zentromer zu den Telomeren hin aufsteigend nummeriert. Ebenso sind die Banden innerhalb einer Region vom Zentromer zu den Telomeren hin aufsteigend nummeriert. Eine Translokation zwischen Chromosom 11 auf dem kurzen und Chromosom 22 auf dem langen Arm wird durch $t(11;22)(p13.2;q12.1)$ präzise beschrieben. Die Auflösung einer Karyotypisierung wird durch die Anzahl der Farbwechsel in je einem Chromosom aller 23 Chromosomenpaare beschrieben. Je nach Qualität und Zweck der Aufarbeitung sind insgesamt zwischen 300 und 800 Banden zu sehen. Die Zellen werden ohne Zugabe

von Methotrexat aufgearbeitet, da dieses Zellgift Chromosomenaberrationen verursachen kann und damit die Bestimmung der spontanen Translokationsrate verfälscht würde.

Die Karyotypisierung und Chromosomenanalyse von ALS-Patienten dient dazu, konstitutionelle und spontane Chromosomenaberrationen und deren Häufigkeit im Vergleich zu Kontrollpersonen zu bestimmen. Die Karyotypisierung und Chromosomenanalyse wurde bei zehn Patienten und sechs Kontrollen durchgeführt. Pro Fall wurden 19 Karyogramme ausgewertet. Es zeigte sich bei den Patienten eine Rate von 0,02 spontanen Translokationen/Zelle und von 0,03 anderen strukturellen Aberrationen/Zelle. Bei den Kontrollpersonen wurden 0,04 Translokationen/Zelle und 0,02 andere strukturelle Aberrationen/Zelle analysiert. Deletionen, Inversionen und Duplikationen werden in der Gruppe der anderen strukturellen Aberrationen zusammengefasst. Der U-Test zeigt keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,35$ bzw. $p = 0,23$) zwischen Patienten und Kontrollen im Hinblick auf Translokationen, Deletionen, Inversionen und Duplikationen.

Tabelle 9: strukturelle Aberrationen nach GTG-Bänderung bei Kontrollen (K) und Patienten (P): untersuchte Mitosen (M), Translokation (t), Deletion (del), Inversion (inv), Duplikation (dup). Der Mittelwert (MW) ist die Summe der Beobachtungen/Anzahl der Beobachtungen.

K	M	t	del/inv/dup	P	M	t	del/inv/dup
jw003 K	18	0	0	jw001 P	16	0	0
jw006 K	16	1	0	jw005 P	22	2	1
jw010 K	19	0	0	jw007 P	19	1	0
jw012 K	20	0	2	jw011 P	17	0	1
jw015 K	20	1	0	jw013 P	19	0	1
jw025 K	19	3	0	jw016 P	22	0	1
				jw018 P	20	0	1
				jw020 P	21	1	0
				jw021 P	16	0	1
				jw024 P	19	0	0
MW: K	18,7	0,83	0,33	MW: P	19,1	0,4	0,6
MW/Zelle		0,045	0,02	MW/Zelle		0,02	0,03

3.2 Analyse der SCE-Rate

Der Schwesterchromatidaustausch (SCE) spiegelt die DNA-Reparaturaktivität der Chromosomen wider und ist damit ein indirekter Marker für chromosomale Instabilität.

Durch den Einbau des Thymidinbasenanalogs Bromodesoxyuridin (BrdU) in der Synthesephase und durch die anschließende Photolyse werden BrdUsubstituierte DNA-Regionen abgebaut und mit dem Puffer abgewaschen. Mit der degradierten DNA gehen auch die Proteine verloren, an die Giemsa gebunden werden kann. Der substituierte DNA-Strang ist dadurch schwächer gefärbt als der unsubstituierte. Nach der ersten Replikation sind die Schwesterchromatiden aller Chromosomen gleichmäßig dunkel gefärbt, weil in jedem Schwesterchromatid der neue Tochterstrang durch BrdU ersetzt wurde (unifilar), der andere ist unverändert geblieben. Hat die Mitose schon eine zweite Synthesephase durchlaufen, so ist ein

Chromatid schwächer gefärbt, weil es nun vollständig mit BrdU substituiert wurde (bifilar) (s. Abb. 2 S. 35). Jetzt wird ein Austausch zwischen den verschieden stark gefärbten Schwesterchromatiden sichtbar. Chromosomen in dieser Phase werden auch „Harlekin-Chromosom“ genannt. Bei drei und mehr durchlaufenen Synthesephasen ist das Chromosom dann im Ganzen schwächer gefärbt, was die Auswertung der SCE-Raten unmöglich macht (www.uni-kl.de/FB-Biologie/AG-Zankl/chrab.html).



Abbildung 7: Mitose in der 2. Synthesephase nach BrdU-Zugabe: nicht gewertete Farbwechsel (*), gewertete Farbwechsel (**)

Farbintensitätswechsel, die am Zentromer beginnen, werden nicht gewertet, da sie nicht nur durch ein Chromatid austausch, sondern auch durch eine Verdrehung des Chromosoms zustande kommen können. Außerdem wird ein SCE nur gewertet, wenn sich das Gegenstück auf dem gegenüberliegenden Chromatid an der gleichen Stelle befindet. Jeder gewertete Farbwechsel entspricht einem SCE. Normalwerte der SCE-Raten liegen zwischen 2-10 SCE/Mitose, meist 5-8 SCE/Mitose (www.uni-kl.de/FB-Biologie/AG-Zankl/chrab.html).

In der vorliegenden Arbeit wurden SCE-Raten bei zehn ALS-Patienten bestimmt. Da BrdU mutagene Eigenschaften hat und somit einen Chromatid austausch stimulieren kann, wurden neben den Patienten auch Verwandte und Kontrollpersonen untersucht. In den jeweiligen Gruppen befanden sich sieben Kontrollen und neun Verwandte. Wie der folgenden Tabelle zu entnehmen ist, liegen die SCE-Raten bei 25 ausgewerteten Mitosen je Fall in allen drei Gruppen im Rahmen der Normalwerte. Die Mittelwerte und Standardabweichungen (STABW) der drei Gruppen wurden berechnet. Zwischen der Patienten- und der Kontrollgruppe besteht im U-Test kein signifikanter Unterschied ($p = 0,43$).

Tabelle 10: SCE-Rate der Kontrollen, Verwandten und Patienten und ihr Mittelwert (MW) mit Standardabweichung (STABW).

Kontrollen	SCE/Zelle	Verwandte	SCE/Zelle	Patient	SCE/Zelle
jw003	6,9	jw002/Tochter	7,2	jw001	7,8
jw006	6,4	jw004/Tochter	6,6	jw005	6,5
jw010	8,4	jw009/Tochter	7,0	jw007	9,5
jw012	8,4	jw008/Schwester	8,0	jw011	9,0
jw015	5,6	jw014/Sohn	5,1	jw013	5,8
jw025	8,6	jw017/Tochter	10,4	jw016	7,9
jw028	6,9	jw019/Tochter	7,0	jw018	8,4
		jw022/Bruder	6,1	jw020	6,6
		jw023/Tochter	6,9	jw021	8,2
				jw024	9,2
MW	7,31	MW	7,14	MW	7,89
STABW	1,078	STABW	1,375	STABW	1,178

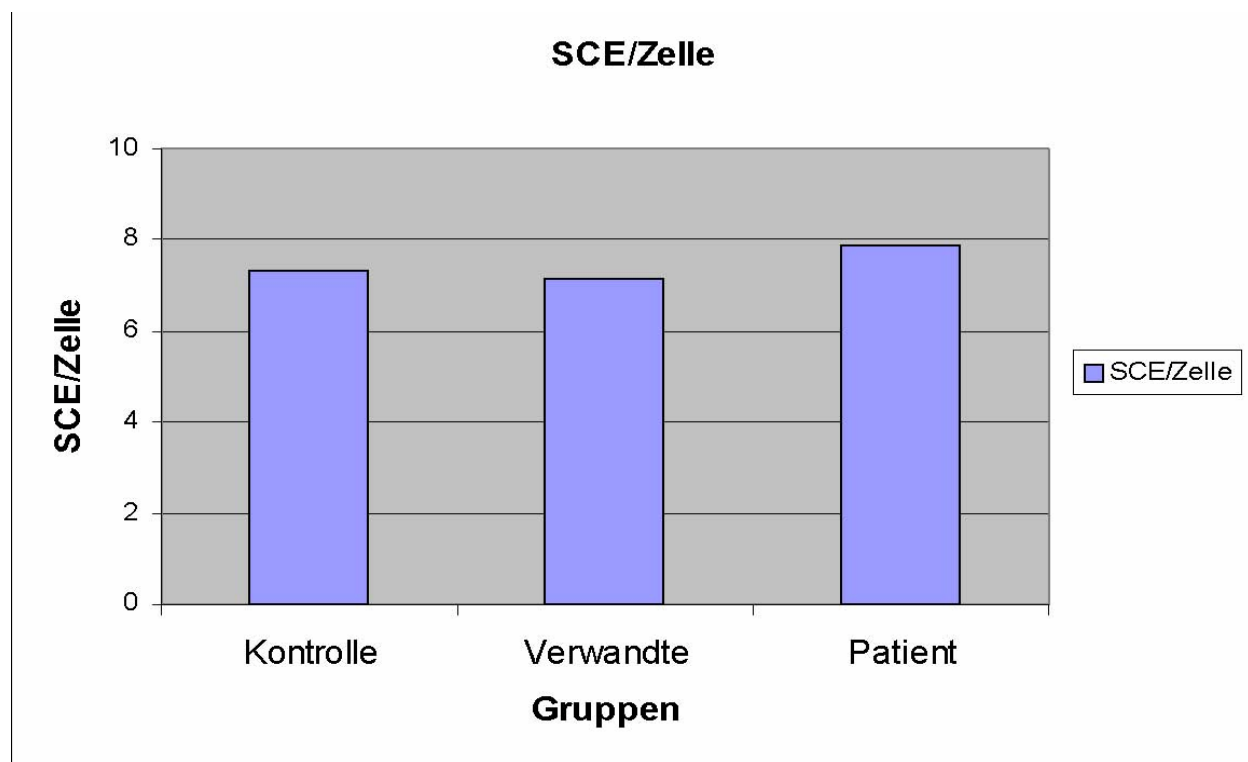


Abbildung 8: SCE-Raten der drei Gruppen.

Summiert man die Zellen mit einer bestimmten SCE-Häufigkeit in einem Diagramm auf, so ergibt sich in allen drei Gruppen eine Normalverteilung mit einem Maximum bei 6-7 Austauschen/Zelle. Es sind vereinzelte Zellen mit mehr als 14 und weniger als 4 Austauschen nachweisbar. Wie dem folgenden Diagramm zu entnehmen ist, ist der Kurvenverlauf in der Kontroll-, Verwandten- und Patientengruppe annähernd gleich.

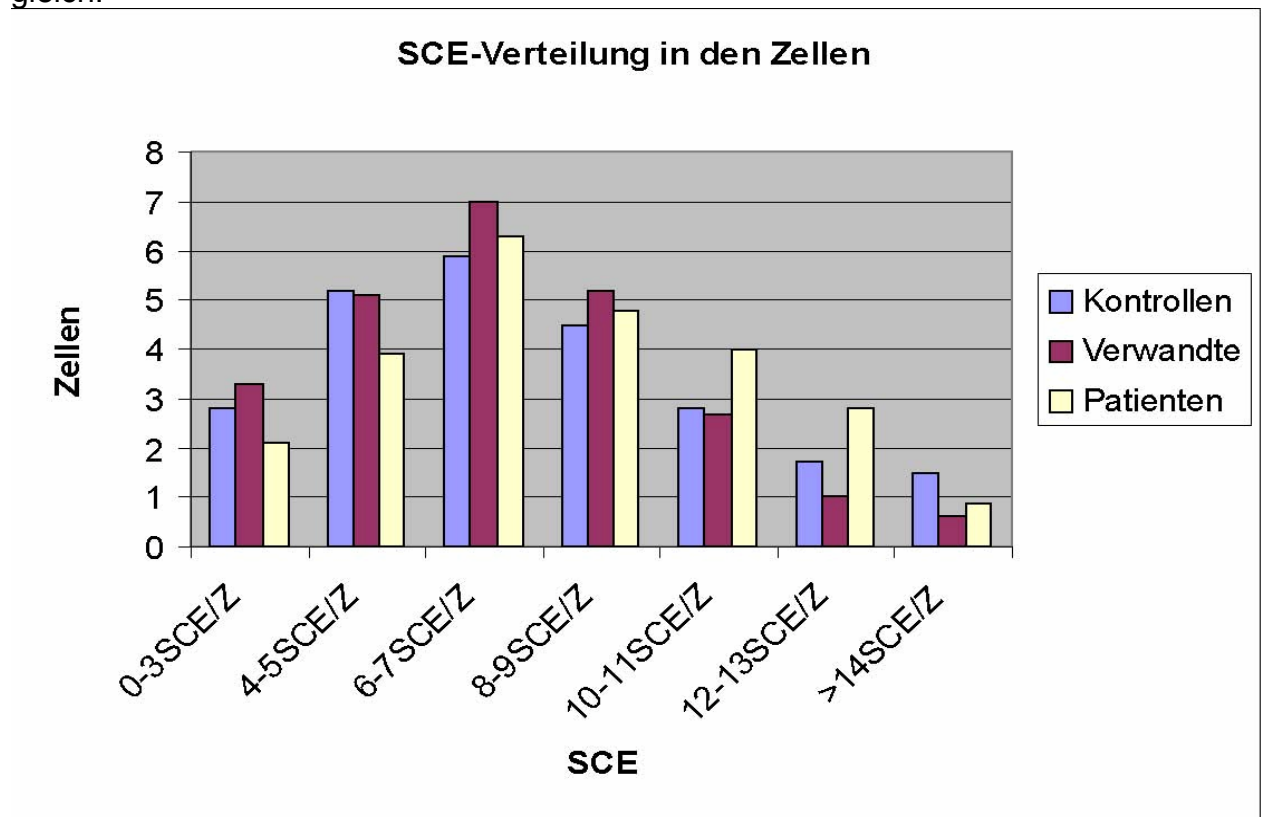


Abbildung 9: Verteilung der SCEs in den Zellen der Patienten-, Kontroll- und Verwandtengruppe.

3.3 Bestimmung der spontanen und induzierten Bruchrate mit Bleomycin

Die Induktion von Brüchen durch Bleomycin wurde an einer Auswahl von sechs Patienten, fünf Blutsverwandten und vier Kontrollen durchgeführt. Es wurden pro Fall 25 Mitosen auf Chromatid- und Chromosomenbrüche und azentrische Fragmente untersucht. Jeder Chromatid- und Chromosomenbruch und jedes azentrische Fragment wird als ein Bruchereignis gewertet. Färbelücken (*chromatidgaps*) werden zwar erfasst, aber nicht als Bruch gewertet.

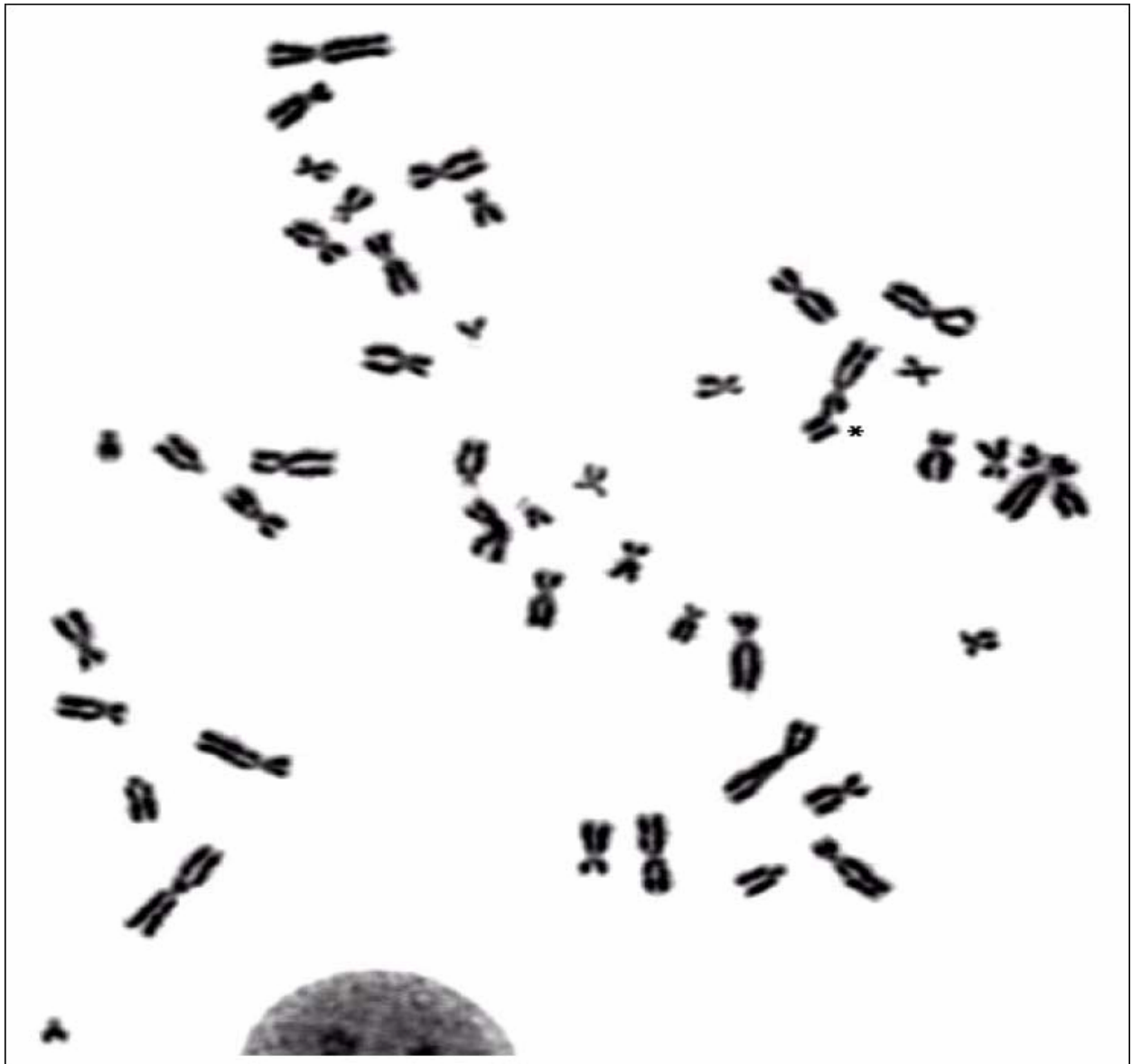


Abbildung 10: Mitose mit 43 Chromosomen (unvollständig) nach Zugabe von 10 µg/ml Bleomycin: Chromtidbruch (*).

Die gemittelten spontanen Bruchraten (arithmetischer Mittelwert) der Kontrollgruppe mit 0,00 Brüche/Zelle (B/Z), der Verwandtengruppe mit 0,02 B/Z und der Patientengruppe mit 0,01 B/Z liegen im unteren Bereich bzw. sogar unter den Durchschnittswerten von 0,02-0,04 B/Z. Bei Zugabe von 1 µg/ml Bleomycin liegt die Patientengruppe mit 0,15 B/Z unter der Kontrollgruppe mit 0,17 B/Z. Die Verwandten reagieren mit 0,1 B/Z am wenigsten sensitiv auf Bleomycin. Bei der höchsten Bleomycinkonzentration (10 µg/ml) liegt die Patientengruppe mit 0,7 B/Z unter der Verwandten- und Kontrollgruppe mit 0,71 bzw. 0,87 B/Z. Der U-Test liefert keinen Anhalt für eine Signifikanz hinsichtlich erhöhter Bruchraten unter steigenden Bleomycinkonzentrationen in der Patientengruppe ($p = 0,4; 0,6; 0,8$).

Tabelle 11: Zahl der Brüche/Zelle bei 0 µg/ml, 1 µg/ml bzw. 10 µg/ml Bleomycinkonzentration in den Kontrollen (K), Verwandten und Patienten (P).

Personen	Bleo 0 µg/ml	Bleo 1 µg/ml	Bleo 10 µg/ml
jw012/K	0	0,12	1,28
jw015/K	0	0,12	0,4
jw030/K	0	0,44	0,48
jw026/K	0	0	1,32
jw014/Sohn	0,08	0,16	0,44
jw017/Tochter	0,04	0	0,72
jw019/Tochter	0	0,24	0,48
jw022/Bruder	0	0,12	1,28
jw023/Tochter	0	0	0,64
jw011/P	0	0,12	0,84
jw013/P	0	0,04	0,76
jw016/P	0	0,12	0,08
jw018/P	0	0,16	0,72
jw020/P	0	0,2	1,32
jw021/P	0,04	0,24	0,48

Mit folgendem Diagramm wird noch einmal der Anstieg der Brüche/Zelle mit steigender Bleomycinkonzentration in den drei Gruppen (Mittelwerte) deutlich.

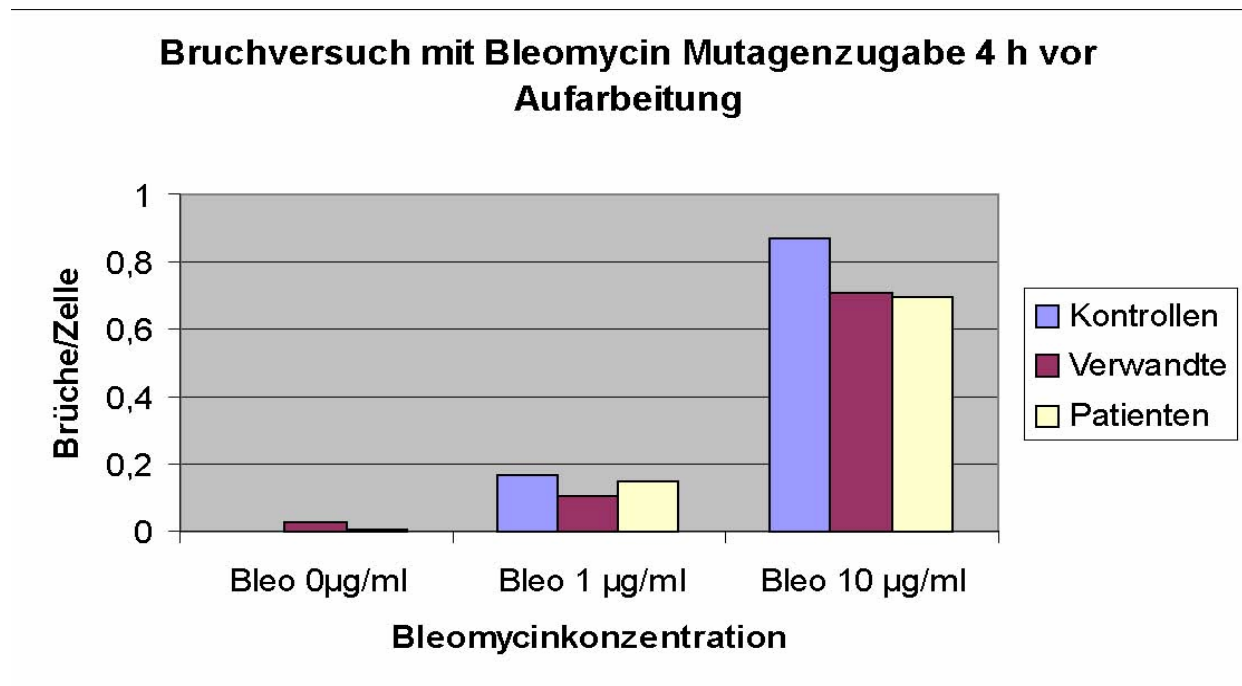


Abbildung 11: Zahl der Brüche/Zelle bei 0 µg/ml, 1 µg/ml bzw. 10 µg/ml Bleomycinkonzentration in der Kontroll-, Verwandten- und Patientengruppe.

Betrachtet man die Verteilung der Bruchereignisse, so sind in allen drei Gruppen und den verschiedenen Bleomycinkonzentrationen die Chromatidbrüche (ctb) mit Abstand am häufigsten vertreten.

Tabelle 12: Anzahl der Chromatidbrüche (ctb), Chromosomenbrüche (csb) und *chromatidgaps* (ctg) in der Kontroll-, Verwandten- und Patientengruppe

. Gruppen	ctb	csb	ctg
Kontrollen 0 µg/ml	0	0	0,07
Verwandte 0 µg/ml	0,08	0,02	0
Patienten 0 µg/ml	0,01	0	0
Kontrollen 1 µg/ml	0,15	0	0,1
Verwandte 1 µg/ml	0,07	0,01	0,04
Patienten 1 µg/ml	0,14	0	0,05

Gruppen	ctb	csb	ctg
Kontrollen 10 µg/ml	0,80	0,03	0,30
Verwandte 10 µg/ml	0,66	0,04	0,21
Patienten 10 µg/ml	0,79	0,03	0,30

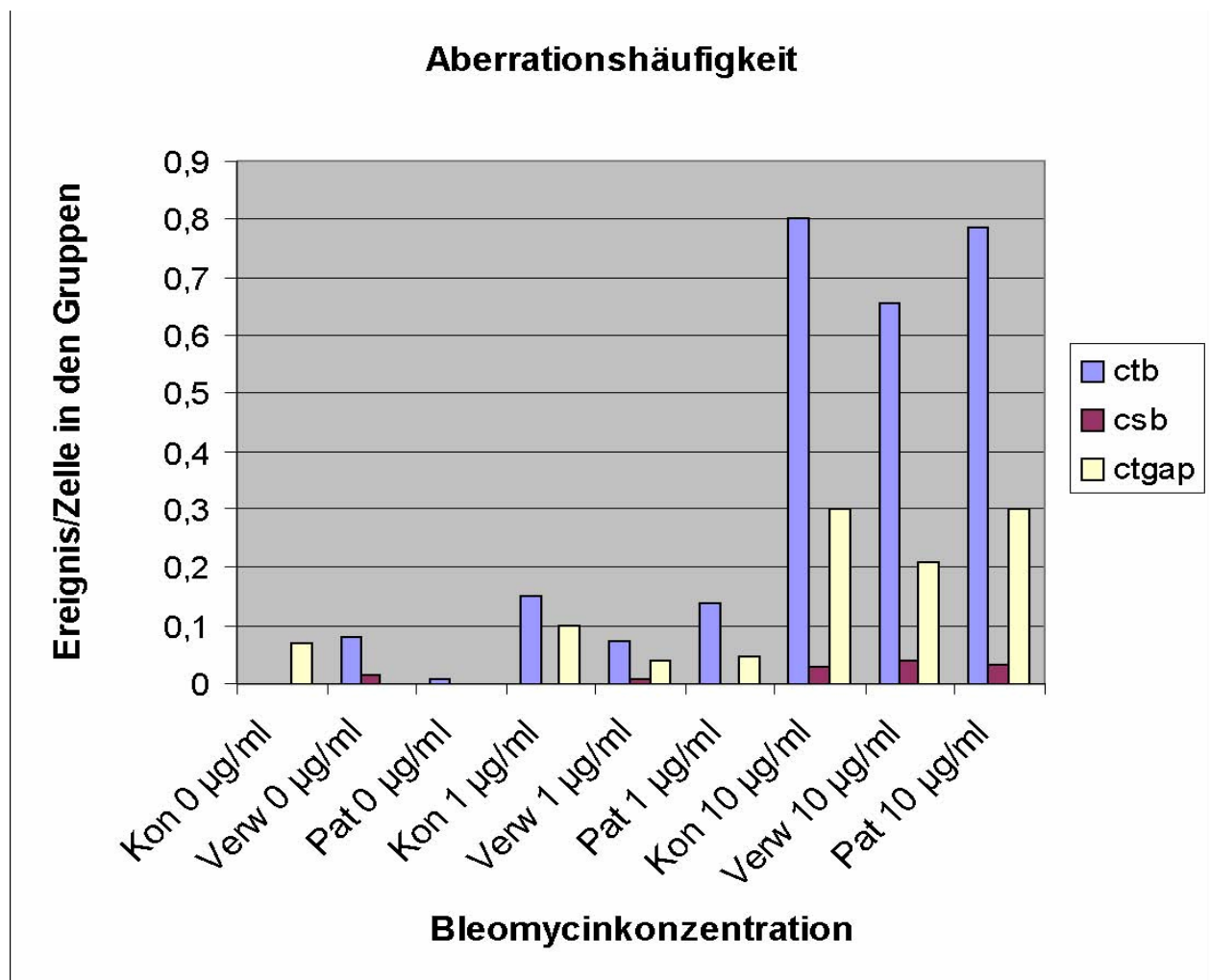


Abbildung 12: Anzahl der Defekte in den Kontroll-, Verwandten- und Patientengruppen bei entsprechender Bleomycinkonzentration: Chromatidbruch (ctb), Chromosomenbruch (csb), *chromatidgap* (ctgap).

Die Berechnung der Brüche/Einzelzelle (B/EZ) spiegelt wider, wie viele Brüche in jeder betroffenen Zelle, also in einer Zelle mit mindestens einem Bruchereignis, zu finden sind. Wächst die Zahl der B/EZ mit steigender Bleomycinkonzentration, so sind trotz steigender Bruchrate nicht mehr Zellen betroffen. Während mit steigender

Bleomycinkonzentration bei den Kontrollen und Verwandten die Zahl der Brüche in den betroffenen Zellen steigt, also wenige Zellen stärker betroffen sind, bleibt diese in der Patientengruppe fast gleich (von 1,66 auf 1,68 B/EZ in der Patientengruppe, von 1,32 auf 1,76 B/EZ in der Kontrollgruppe). Das heißt, dass mit steigender Bleomycinkonzentration die Zahl der Brüche in den Zellen der Patienten mit mindestens einem Bruchereignis nicht zunimmt, demzufolge die Zahl der betroffenen Zellen ansteigt. Die Rate an Zellen mit mindestens einem Bruchereignis scheint in der Patientengruppe erhöht, zeigt jedoch im U-Test keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe ($p = 0,4; 0,5; 0,8$).

Tabelle 13: Anzahl der Brüche/Einzelzelle in den Kontroll-, Verwandten- und Patientengruppen bei 0 µg/ml, 1 µg/ml und 10 µg/ml Bleomycin.

Gruppen	B/EZ Bleo 0 µg/ml	B/EZ Bleo 1 µg/ml	B/EZ Bleo 10 µg/ml
Kontrollen	0	1,32	1,76
Verwandte	0,4	0,87	1,99
Patienten	0,17	1,66	1,68

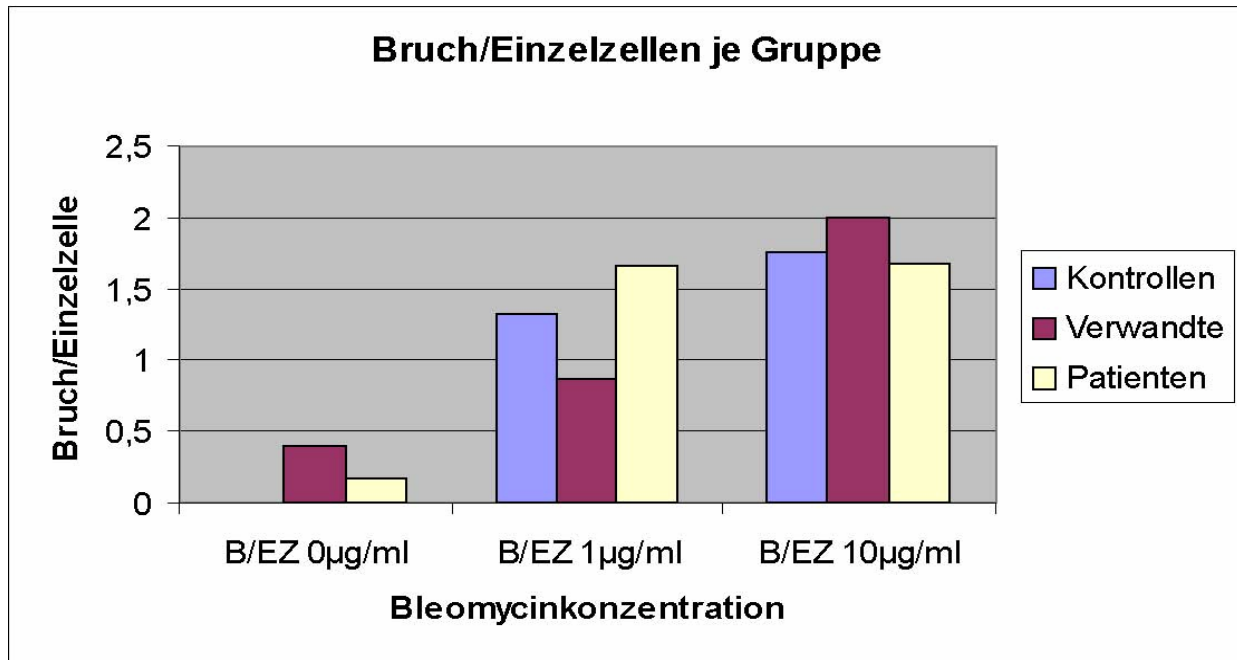


Abbildung 13: Brüche/Einzelzelle (B/EZ) in der Kontroll-, Verwandten- und Patientengruppe.

Betrachtet man die Zahl der aberranten Zellen, so sind in der Patientengruppe bei 0 µg/ml Bleomycin weniger Zellen betroffen. Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant ($p=0,2; 0,5; 0,6$).

Tabelle 14: prozentuale Häufigkeit aberranter Zellen (% aZ) unter Bleomycinzugabe.

Bleomycin-konzentration	Kontrollen % aZ	Verwandte % aZ	Patienten % aZ
Bleo 0 µg/ml	6	3	1
Bleo 1 µg/ml	14	7	11
Bleo 10 µg/ml	43	37	45

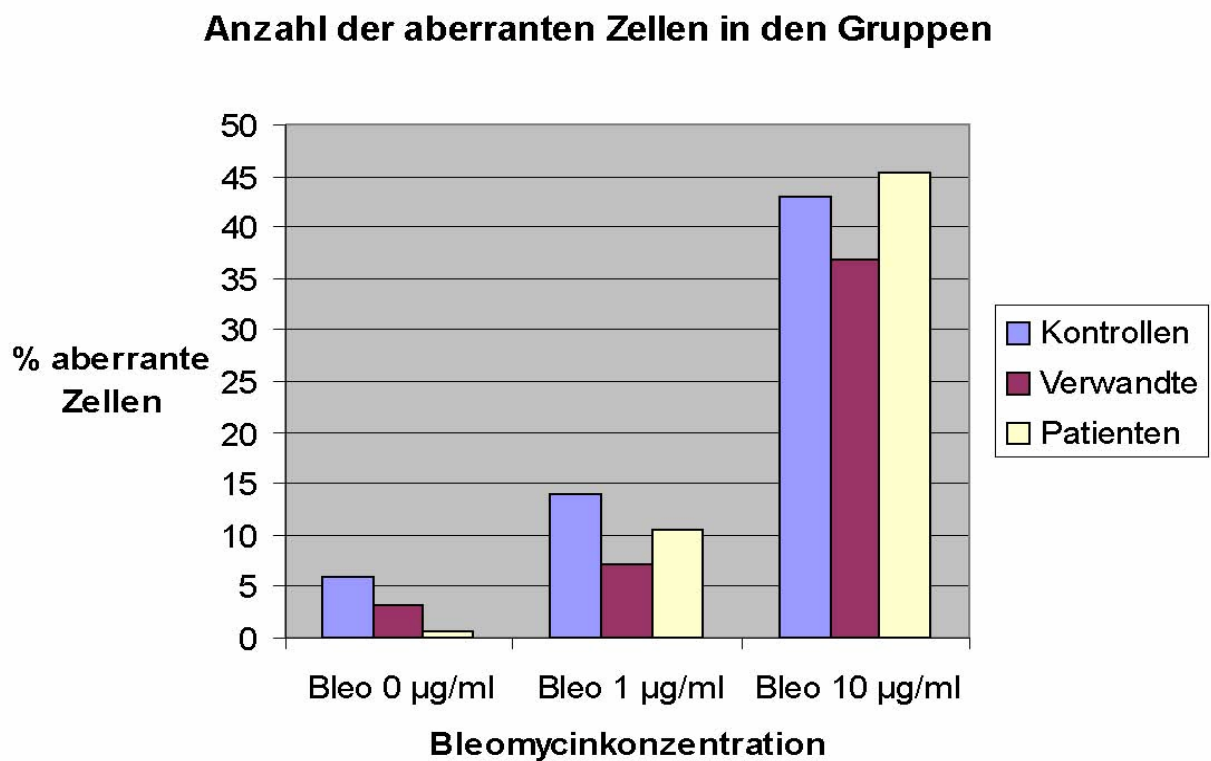


Abbildung 14: Prozent der aberranten Zellen unter Bleomycinbelastung.

3.4 Bestimmung der Translokationsrate mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) dient dem Nachweis struktureller Chromosomenaberrationen. Beim *whole chromosome painting* wird das gesamte Chromosom hybridisiert, um die Zahl der Translokationen dieses Chromosoms zu bestimmen. Für die Hybridisierung werden fluoreszenzmarkierte Sonden für die Chromosomen 3, 5 und 7 verwendet. Jede Mitose wird im Fluoreszenzmikroskop mit drei verschiedenen Filtern betrachtet. Nach DAPI-Färbung stellen sich hybridisierte als auch nicht hybridisierte Chromosomen unter dem DAPI-Filter blau dar. Der TRITC-Filter macht den roten Fluoreszenzfarbstoff sichtbar und mit ihm die beiden Chromosomenpaare 3 und 5. Unter dem FITC-Filter ist das Chromosomenpaar 7 grün zu sehen. Hat eine Translokation zwischen nicht homologen Chromosomen stattgefunden, so wird ein Farbwechsel innerhalb eines Chromosoms sichtbar. Ein Farbwechsel zwischen einem hybridisierten und einem nicht hybridisierten Chromosom wird als Ereignis als Folge einer stattgefundenen Translokation gewertet. Sind an einer Translokation zwei hybridisierte Chromosomen beteiligt, so werden sie als zwei Ereignisse gewertet. Translokationen zwischen den Chromosomen 3 und 5 sind auf Grund unterschiedlicher Farbintensität, Größe und Zentromerlage der Chromosomen zu erkennen.

Es wurden die spontanen Translokationsraten von 37 Patienten und 26 Kontrollen mittels FISH bestimmt. Unter den Patienten sind 32 mit sporadischer ALS (sALS), 2 mit familiärer ALS (fALS), 1 Patient mit ALS-assoziiierter frontotemporaler Demenz (ALS-FTD) und 2 Patienten mit progressiver Muskelatrophie (PMA), einer Unterform der ALS. Die Kontrollen sind Ehepartner der Patienten oder andere asymptotische Personen.

Die Beteiligung der Chromosomen an somatischen Translokationen ist vor allem von ihrer Größe abhängig (Bickmore/Teague, 2002). Die Größe der Chromosomen wird in der Anzahl der Basenpaare angegeben. Die Gesamtgröße des Genoms beträgt 2907 Megabasenpaare (Mbp). Chromosom 3 mit 200 Mbp, Chromosom 5 mit 186 Mbp und Chromosom 7 mit 146 Mbp entsprechen zusammen 18,2 % des Genoms (Venter et al., 2001). Ausgehend von diesen 18,2 % wurde ihre Translokationsrate auf das Gesamtgenom umgerechnet. Die in der folgenden Tabelle angegebenen Translokationsraten der Kontrollpersonen und Patienten beziehen sich auf das Gesamtgenom einer Zelle.

Tabelle 15: Häufigkeit von Translokationen/Zelle (t/Z) in der Patienten- und Kontrollgruppe: Mittelwert (MW) mit Standardabweichung (STABW).

Status	Mitosen	t/Z	Status	Mitosen	t/Z
Kontrolle	524	0,032	ALS	528	0,042
Kontrolle	518	0,054	ALS	527	0,074
Kontrolle	502	0,044	ALS	516	0,011
Kontrolle	540	0,072	ALS	0	0
Kontrolle	509	0,011	ALS	469	0,036
Kontrolle	528	0,158	ALS	512	0,033
Kontrolle	240	0,093	ALS	503	0,011
Kontrolle	218	0,025	ALS	260	0,043
Kontrolle	504	0,033	ALS	480	0,093
Kontrolle	566	0,029	fALS	319	0,017
Kontrolle	211	0	ALS	502	0,011
Kontrolle	490	0	ALS	507	0,077
Kontrolle	395	0	ALS	502	0,055
Kontrolle	388	0,014	ALS	259	0,150
Kontrolle	488	0	ALS	510	0,044
Kontrolle	483	0,012	ALS	513	0,087
Kontrolle	500	0,022	ALS-FTD	527	0,021
Kontrolle	292	0,019	ALS	499	0,022

Status	Mitosen	t/Z	Status	Mitosen	t/Z
Kontrolle	501	0,033	fALS	196	0,142
Kontrolle	300	0,055	ALS	244	0,023
Kontrolle	503	0	ALS-PMA	516	0,043
Kontrolle	185	0	ALS	447	0
Kontrolle	522	0,01	ALS-PMA	510	0,044
Kontrolle	380	0,058	ALS	517	0,054
Kontrolle	203	0,081	ALS	503	0,011
Kontrolle	206	0,027	ALS	526	0,074
			ALS	522	0,032
			ALS	516	0,043
			ALS	229	0
			ALS	535	0,073
			ALS	499	0,022
			ALS	511	0,054
			ALS	241	0,023
			ALS	500	0,067
			ALS	503	0,099
			ALS	545	0,031
			ALS	522	0,085
MW		0,034	MW		0,047
STABW		0,039	STABW		0,036

Das durchschnittliche Auftreten spontaner Translokationen in einer Zelle beträgt in der Patientengruppe 0,047 t/Z und in der Kontrollgruppe 0,034 t/Z. Dies ist im U-Test kein signifikanter Unterschied ($p = 0,08$).

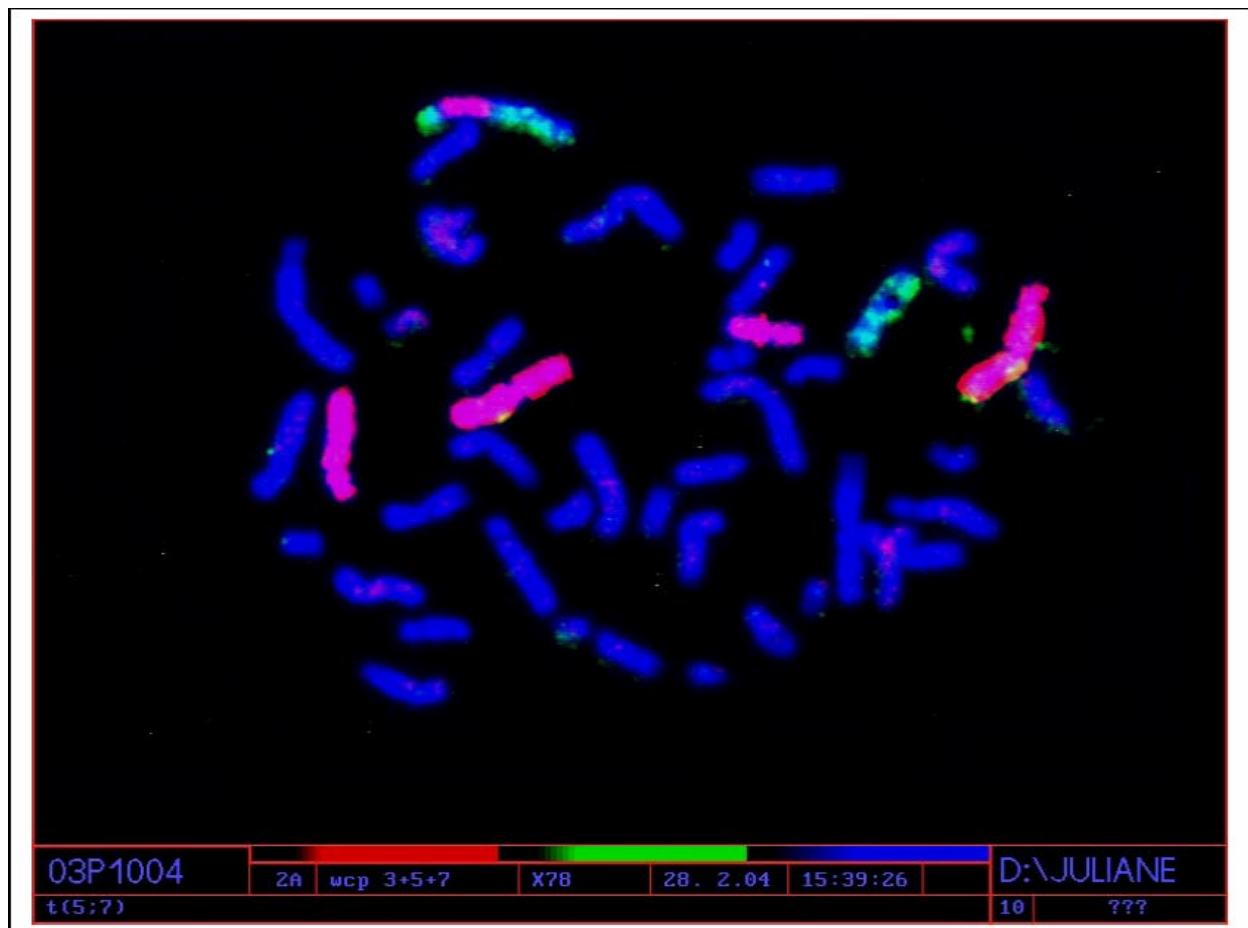


Abbildung 15: WCP #3, #5, #7 mit t(5;7) und t(5;?).

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden ALS-Patienten auf chromosomale Instabilität untersucht. Bei der Pathogenese sowohl der familiären als auch der sporadischen ALS muss man von einem sehr komplexen Vorgang ausgehen, der die Summe beeinflussender Größen darstellt. Bisher wurden bei Patienten mit familiärer ALS mehr als 10 verschiedene Genloci beschrieben, in denen Translokationen auftraten. Es ist auch bei der sporadischen ALS nicht von einem monokausalen Ereignis auszugehen. Die in Einzelfällen aufgetretenen konstitutionellen Translokationen, die unter den sALS-Patienten signifikant erhöht sind und deren Ursache bisher ungeklärt ist, gaben Anlass zu weiteren genetischen Untersuchungen. Dabei wurden bei einigen Patienten unterschiedlichste somatische Chromosomenveränderungen beobachtet, die auf eine chromosomale Instabilität als möglichen pathogenetischen Mechanismus hindeuteten. Um zu prüfen, ob es sich bei diesen Ereignissen um Folgen exogener oder stochastischer Faktoren handelt oder ob sie tatsächlich in einem Zusammenhang mit der Pathogenese der ALS zu sehen sind, wurden zusätzliche Untersuchungen durchgeführt, die im folgenden Teil beschrieben werden.

Zu diskutieren sind dabei neben der Wahl des Materials und der Methoden auch die Zusammenhänge zwischen der gezielten Degeneration der Motoneuronen, der Schädigung der Chromosomen durch oxidativen Stress und den untersuchten Chromosomenaberrationen in den Lymphozyten.

4.1 Material: Lymphozyten statt Motoneuronen

Üblicherweise werden in der Zytogenetik Blutlymphozyten untersucht, da sie einfach zu gewinnen sind und mittels Zellkulturmedien zur Teilung stimuliert werden können. Auch Knochenmarkszellen und Fibroblasten kommen in der Zytogenetik zum Einsatz, haben aber den Nachteil einer aufwendigeren Gewinnung und Kultivierung. Voraussetzung für eine zytogenetische Analyse ist die Kondensation der Chromosomen während der Mitose. Nur in dieser Phase sind die einzelnen Chromosomen und mögliche Chromosomenaberrationen zu identifizieren.

Um bekannte konstitutionelle Translokationen zu bestätigen, ist es auch möglich, nicht kondensierte Chromosomen mit fluoreszenzmarkierten Sonden zu hybridisieren. Liegt eine Translokation vor, sind dann statt zwei Signale drei Signale im Kern sichtbar. Bei der Suche nach sporadisch auftretenden Aberrationen jedoch die Chromosomenkondensation und damit die Mitose für die Analyse notwendig. Die für die ALS pathogenetisch wichtige Zellpopulation der Motoneuronen ist wie alle Nervenzellen postmitotisch und auch in der Zellkultur nicht erneut stimulierbar. Somit sind Nervenzellen für die zytogenetische Diagnostik nicht geeignet. Sind die sporadisch auftretenden Aberrationen auf nur eine bestimmte Zellpopulation beschränkt, bleiben sie bei der Untersuchung von Blutlymphozyten verborgen. Strukturell und numerisch unauffällige Lymphozyten schließen demzufolge eine Chromosomenaberration in den Motoneuronen nicht aus. Allerdings wurden bei M. Parkinson Patienten Folgen oxidativer DNA-Schädigung in Form von erhöhten Mikronukleizahlen, Einzelstrangbrüchen und oxidierten Purinbasen in Lymphozyten beschrieben, obwohl die Zellschädigung, ähnlich wie bei der ALS, nur durch die Degeneration von Nervenzellen symptomatisch wird (Migliore, 2002).

4.2 Methodenwahl: Bänderung versus FISH

Eine bewerte Methode der Zytogenetik ist die Karyotypisierung nach GTG-Bänderung. Durch die Bänderung kann jedes Chromosom identifiziert werden und je nach Auflösung, Kondensationsgrad des Chromosoms und Färbequalität eine genaue Lokalisation von Chromosomenaberrationen erfolgen. Neben der Translokation werden auch Duplikation, Inversion und Deletion einzelner Chromosomen sichtbar. Die dazu notwendige Karyotypisierung ist eine zeitintensive Analyse, die einer spezialisierten methodischen Fertigkeit und einer genauen Kenntnis der Chromosomenbänderung bedarf. Das Auftreten spontaner Aberrationen kann bei geschwächter Immunabwehr, durch Medikamente und durch andere exogene Faktoren beeinflusst werden. Auch bei der Kultivierung kann es durch laborspezifische Bedingungen zu Chromosomenveränderungen kommen. Diese Einflussgrößen wurden durch die parallele Durchführung einer Untersuchung von Patienten und Kontrollen minimiert. Um eine möglichst objektive Auswertung zu gewährleisten, wurden bei allen Untersuchungen die Proben verblindet. Die Verblindung wurde von einer unabhängigen Person vorgenommen. Es bleibt allerdings nicht aus, dass Karyogramme nicht eindeutig zu beurteilen sind. Fehlerquellen sind Überlagerungen von Chromosomen, Stauchungen, die als Deletion gedeutet werden können oder Färbeartefakte in Folge nicht optimaler Trypsinierung.

Auf der Suche nach bestimmten strukturellen und numerischen Ereignissen ist die GTG-Bänderung heute noch die Methode der Wahl in der Zytogenetik. Sie ist kostengünstig und bei exakter Durchführung reproduzierbar. Von Nachteil ist die begrenzte Zahl analysierter Mitosen, da die Auswertung sehr zeitaufwendig ist. So wurden in der hier vorgestellten Arbeit pro Fall 19 Mitosen karyotypisiert und analysiert. Dies ist für die Dokumentation sporadischer Chromosomenaberrationen nicht hinreichend repräsentativ.

Anlass zur Karyotypisierung gaben unter anderem Befunde der hier untersuchten ALS-Patienten aus einem externen zytogenetischen Labor, die Auffälligkeiten in den Chromosomen in Form gehäufte spontaner struktureller Aberrationen zeigten. Die Tatsache, dass wir solche Auffälligkeiten nicht reproduzieren konnten, kann viele Ursachen haben. Neben den genannten Unzulänglichkeiten scheint die subjektive Auswertung und Interpretation von möglichen Aberrationen ein entscheidender

Faktor zu sein.

Bei der Karyotypisierung nach GTG-Bänderung zeigten sich in der Patientengruppe weder eine erhöhte spontane noch eine erhöhte konstitutionelle Translokationsrate im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch andere strukturelle oder numerische Aberrationen bewegten sich im Normbereich.

Objektiver und für die Fragestellung effektiver als die Karyotypisierung ist die quantitative Suche nach spontanen Translokationen mittels *whole chromosome painting*. Auch hierbei zeigte sich kein Unterschied zwischen der Kontroll- und der Patientengruppe. Im Gegensatz zur klassischen Karyotypisierung wurden bei der FISH drei Chromosomen herausgegriffen, die auf Translokationen untersucht wurden. Die Beteiligung eines Chromosoms an Translokationen ist neben der Gendichte und der Lage des Chromosoms im Zellkern vor allem von der Größe des Chromosoms abhängig (Bickmore/Teague, 2002). Mit der bekannten Basenlänge der einzelnen Chromosomen lässt sich ausgehend von den drei hybridisierten Chromosomen 3, 5 und 7 auf die Translokationsrate des Gesamtgenoms rückschließen (Lucas, 1993; Schmidberger et al., 2001; Rezacova et al., 2003). Die Identifikation von Translokationen bleibt so zwar auf drei Chromosomen beschränkt, ist aber leichter und schneller durchzuführen als nach GTG-Bänderung. Intrachromosomale Defekte wie Inversion, Deletion und Duplikation bleiben bei der Hybridisierung verborgen, denn das gesamte Chromosom wird einheitlich markiert. Mit Hilfe der Fluoreszenzmarkierung war es möglich, etwa 500 Mitosen jeder untersuchten Person auszuwerten. Damit lässt sich eine weitaus repräsentativere Aussage über spontane Translokationen machen als mit 19 Karyogrammen der GTG-Bänderung. Bei der erhöhten Patienten- und Kontrollzahl handelt es sich um neu gewonnene Personen, da die vorhandenen Proben nicht mehr ausreichend waren und teilweise auf Grund der ALS-bedingten hohen Mortalität keine

erneute Blutentnahme bei den schon untersuchten Patienten möglich war. Deshalb wurde die Hybridisierung an einer anderen Patienten-und Kontrollgruppe als die GTG-Bänderung durchgeführt. Auch hier wurden zur Objektivierung der Analysen die Proben verblindet ausgewertet.

Neben dem *whole chromosome painting* gibt es weitere Hybridisierungsmethoden mit denen sich Translokationsraten bestimmen lassen. Dazu zählen M-FISH (*multicolor FISH*), SKY (*spectral karyotyping*) oder die COBRA-Technik (*combined binary ratio labelling*). Hierbei werden alle Chromosomen mit unterschiedlich markierten Sonden hybridisiert, sodass alle Chromosomen sicher voneinander unterscheidbar sind (Miller/Therman, 2001; Tönnies, 2002). Diese Methoden sind allerdings sehr kostenintensiv und bedürfen spezieller Laborausstattung und Farbfilter.

4.3 Induzierte Chromatidbrüche

Neben der Karyotypisierung dienen auch Bruchversuche der Aufdeckung von chromosomaler Instabilität. Werden Brüche durch mutagene Substanzen wie Bleomycin induziert, ist das Reparatursystem der Zellen besonders beansprucht. Nicht alle Brüche können repariert werden, sodass auch bei gesunden Personen mit steigender Bleomycinkonzentration die Zahl der Zellen, die trotz des Vorhandenseins von Brüchen in die Mitose eintritt, zunimmt. Bei Patienten mit einem defekten Reparatursystem steigt die Zahl der Chromatidbrüche unverhältnismäßig stark an. Das ist bei den klassischen Instabilitätssyndromen wie der Ataxia teleangiectasia, dem Nijmegen-Breakage-Syndroms oder der Fanconi Anämie der Fall (Mathur et al., 2000).

Um auch diese Art der Instabilität bei ALS-Patienten zu untersuchen, wurden Chromosomen von einer Auswahl von Patienten, Kontrollen und Verwandten nach Bleomycinbehandlung auf Brüche analysiert. Der Anstieg der Chromatid- und Chromosomenbrüche erfolgte in allen drei Gruppen proportional zu den Bleomycinkonzentrationen und zeigte keine signifikante Häufung in der

Patientengruppe. Interessant ist die Beobachtung, dass die Zahl der Brüche in den Einzelzellen mit mindestens einem Bruchereignis in der Patientengruppe mit steigender Bleomycinkonzentration einen etwas geringeren Anstieg zu verzeichnen hat (s. Tabelle 13, S. 53). Da es auch in der Patientengruppe zu einem Anstieg der Brüche gekommen ist, wurden also mehr Zellen durch Bleomycin geschädigt. Die steigende Chromatidbruchzahl ist bei den Patienten somit auf eine größere Zellzahl verteilt. Jedoch ist der Unterschied zu Kontrollen im Hinblick auf betroffene Zellen nicht signifikant. Es lässt sich keine Beziehung zwischen der erhöhten Zellschädigung und der ALS-Erkrankung herstellen.

Die Auswertung von Bruchereignissen bedarf besonderer Sorgfalt. So ist es notwendig, ein Bruchereignis genau zu definieren und von einem Färbeartefakt abzugrenzen (s. Abbildung 3, S. 36). Des Weiteren wurden wie auch bei der Karyotypisierung die Proben der Patienten, Kontrollpersonen und Verwandten verblindet und zeitgleich aufgearbeitet.

4.4 Schwesterchromatidaustausch (SCE)

Das klassische DNA-Reparaturmodell geht davon aus, dass es bei der Reparatur des DNA-Strangs zum Austausch zwischen den Schwesterchromatiden kommt, indem das eine Chromatid dem anderen als Matrize dient. Dieser Vorgang wird als homologe Rekombination bezeichnet. Somit ist eine erhöhte SCE-Rate Zeichen einer gesteigerten DNA-Reparaturaktivität (Miller/Therman, 2001). Mit der SCE-Rate lässt sich eine Aussage über die Wirksamkeit exogener und endogener genotoxischer Stoffe machen. Diese Stoffe induzieren Einzel- und Doppelstrangbrüche und in Folge dessen erhöhte SCE-Raten. Ist die SCE-Rate auch ohne das Einwirken von Klastogenen erhöht, spricht das für eine gesteigerte DNA-Reparatur, der eine endogene oder zumindest unbekannte DNA-Schädigung vorausgegangen sein muss. Diese Form der chromosomalen Instabilität findet man bei dem Bloom-Syndrom vor. Die SCE-Rate ist bei den Patienten mit dieser Erkrankung um das 10-20fache erhöht (Miller/Therman, 2001).

4.5 Oxidativer Stress, DNA-Schädigung und Neurodegeneration

An Lymphozyten von sALS-Patienten wurden verschiedene Untersuchungen hinsichtlich einer DNA-Schädigung auf chromosomaler Ebene vorgenommen. Der Verdacht auf eine chromosomale Instabilität als möglichen Risikofaktor für die Ausbildung von ALS ergab sich aus den wiederholt dokumentierten somatischen Aberrationen bei sALS-Patienten. Unterschiedliche somatische Aberrationen in den Zellen eines Patienten können ihre Ursache in einem chromosomalen Instabilitätssyndrom haben. Um sALS-Patienten auf eine Instabilität im Genom hin zu prüfen, wurden zytogenetische Untersuchungen an ihnen und an einer Kontrollgruppe sowie an Verwandten der Patienten vorgenommen. Dabei zeigten sich in keiner der Analysen Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der Patientengruppe im Auftreten von chromosomalen Aberrationen. Eine chromosomale Beteiligung bei der Generierung der sALS kann dennoch nicht vollkommen ausgeschlossen werden.

Die Pathologie der ALS spielt sich überwiegend in den Motoneuronen im Sinne eines vorzeitigen und überschießenden Zelltods der Motoneuronen der Patienten ab. Zur selektiven Vulnerabilität der Motoneuronen und deren Ursachen finden sich die unterschiedlichsten Ansätze und Hypothesen, die bisher allerdings nicht eindeutig verifiziert werden konnten. Vielmehr muss man besonders bei der sporadischen Form der ALS von einem Zusammenspiel der beeinflussenden und Risikofaktoren ausgehen. Im Folgenden werden Ursachenansätze vorgestellt.

Zunächst sind die motorischen Neurone eine sehr spezifische Zellpopulation des menschlichen Organismus. Die räumliche Dimension der motorischen Zellen ist einzigartig. Der Energiebedarf für den axonalen Transport, der auf einer Strecke von bis

zu 1m Länge stattfindet, belastet die Zellen und verursacht durch den gesteigerten Umsatz vermehrt anfallende freie Radikale. Das Gehirn entspricht ca. 2 % der gesamten Körpermasse, metabolisiert aber in etwa 20 % des aufgenommenen Sauerstoffs. Demzufolge fallen hier auch 20 % der Sauerstoffradikale an (Zhu, 2004). Die meisten Radikale werden in den Mitochondrien und mittels Antioxidanzien (Glutathion, SOD-1 und Vitamin E) abgebaut. Ein verminderter Abbau der freien Radikale führt zu vermehrter Oxidation von Proteinen, Lipiden und DNA-Basen. Bogdanov et al. untersuchten die Konzentration oxidierter DNA-Basen (8-Hydroxyl-2-Deoxyguanosin und 8-Hydroxyguanosin) als Marker für oxidativen Stress in Plasma, Urin und Liquor von ALS-Patienten, Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen und von Kontrollen. Die Konzentration an freiem 8-Hydroxyl-2-Deoxyguanosin war bei den ALS-Patienten signifikant erhöht (Bogdanov et al., 2000). Die oxidierten Basen stören das Chromosomengerüst, es kommt zu Einzelstrang- und Doppelstrangbrüchen. Die DNA-Schäden werden von einem umfangreichen Reparatursystem erkannt, der Zellzyklus wird gestoppt, um den Fehler zu reparieren oder, wenn die Reparatur nicht möglich ist, die Apoptose einzuleiten (Uberti et al., 2003). Das Zusammenspiel von oxidativem Stress, DNA-Schaden und Neurodegeneration ist bei Alzheimerpatienten beschrieben worden (Zhu, 2004). Auch Shaikh und Martin beobachteten vermehrt auftretende oxidative DNA-Schäden und eine erhöhte Expression von DNA-Reparaturenzym in Motoneuronen von ALS-Patienten im Vergleich zu Kontrollen und zu anderen Nervenzellen (Shaikh/Martin, 2002).

Eine Akkumulation an DNA-Schäden ist neben Hypoxie, oxidativem Stress, Chemotherapeutika und Ribonukleotidmangel ein Stimulus für die Erhöhung der Enzymaktivität von p53 und den dadurch vermittelten Signaltransduktionsweg, der die Zelle in die Apoptose führt. Während man in Geweben solider Tumore eine Abnahme des p53 Enzyms findet, und damit für die Zellentartung prädisponiert, ist die Enzymaktivität in geschädigtem neuronalen Gewebe induziert. Eine p53-Überexpression führt zur Degeneration des Gewebes. Dies wurde in verschiedenen Nervenzellpopulationen nachgewiesen: in Körnerzelllinien des Kleinhirns, die mit Glutamat stimuliert wurden, in kortikalen Neuronen mit Alzheimer-assoziiierter A β -Überexpression und in Oligodendrozytenzelllinien, die oxidativem Stress ausgesetzt waren (Uberti et al., 2003). Auch in Motoneuronen von einigen ALS-Patienten konnte eine Aktivierung von p53 nachgewiesen werden, während sie in anderen Neuronen eher spärlich zu finden war (Shaikh/Martin, 2002; Martin, 2000).

Neben dem Risikofaktor der erhöhten Konzentration von Oxidanzien in den Motoneuronen scheint auch die Sensibilität gegenüber Glutamat zu der Neurodegeneration beizutragen. Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter des ZNS. Kommt es zur Überstimulation der Glutamatrezeptoren durch erhöhte Glutamatkonzentrationen im synaptischen Spalt oder Glutamatagonisten, so werden neuropathologische Prozesse in den Nervenzellen ausgelöst, die als Exzitotoxizität definiert wurden (Heath/Shaw, 2002). Wird Glutamat von der präsynaptischen Zelle in den synaptischen Spalt sezerniert, so kann er sich an verschiedene Rezeptoren binden: der NMDA-Rezeptor vermittelt eine langsame Erregung in der postsynaptischen Nervenzelle, der AMPA-Rezeptor dagegen eine schnelle. Die GluR2Untereinheit des AMPA-Rezeptors vermindert die Ca $^{2+}$ -Permeabilität der Zellmembran und sorgt damit für die Ca $^{2+}$ -Homöostase in der Zelle (Heath/Shaw, 2002). Eine erhöhte intrazelluläre Ca $^{2+}$ -Konzentration beeinträchtigt die Leistungsfähigkeit der Mitochondrien und hemmt damit den Abbau freier Radikale. In einer Untersuchung von Williams et al. zeigte sich mittels *in situ* Hybridisierung eine signifikant niedrigere Konzentration an GluR2-Untereinheiten in Motoneuronen von ALS-Patienten als in anderen Neuronen dieser Patienten (Heath/Shaw, 2002). Dadurch ist die Ca $^{2+}$ -Permeabilität, die Ca $^{2+}$ -Konzentration in der Zelle und damit die Glutamatsensitivität erhöht. In einem transgenen Mausmodell mit einer Mutation im SOD1-Gen konnte der Ausbruch der ALS durch das Vorhandensein der GluR2-Untereinheit hinausgezögert werden. Bei Tieren mit geringerer Expression von

GluR2 kam die Krankheit früher zum Ausbruch (Tateno et al., 2004). Die verminderte Zahl an GluR2-Untereinheiten könnte also auch bei ALS-Patienten einen negativen Einfluß auf die Krankheitsprogression haben.

Eine hohe extrazelluläre Glutamatkonzentration führt zu einer Funktionsstörung des Austauschtransporters, der Glutamat aus der Zelle und Cystein in die Zelle transportiert. Da Cystein eine Vorstufe von Glutathion, einem wichtigen Antioxidanz der Zelle, ist, kommt es bei dessen mangelnder Einfuhr auch zur Depletion von Glutathion in der Nervenzellen (Heath/Shaw, 2002). Die Zelle ist damit nicht mehr in der Lage, die freien Radikale im gleichen Tempo abzubauen, wie sie durch metabolische Prozesse in der Zelle anfallen. Die Verzögerung der Krankheitsprogression der ALS durch die Einnahme des Antioxidanz Vitamin E konnte bisher nicht eindeutig bestätigt werden, geht aber auch auf die Annahme einer schädigenden Wirkung freier Radikale auf die Zelle zurück (Desnuelle, 2001; Graf, 2005).

Des Weiteren scheint die Cyclooxygenase-2 (COX-2), ein Schlüsselenzym entzündlicher Prozesse, auch an der exzitotoxischen Wirkung von Glutamat beteiligt zu sein. Kelly et al. konnten die Exzitotoxizität in einem transgenen Mausmodell mit einer Überexpression von COX-2 nachweisen (Kelley et al., 1999). Auch Almer et al. demonstrierten in postmortalem Rückenmarksgewebe von sALS-Patienten und in transgenen Mäusen mit SOD-1-Mutation eine Überexpression von COX-2 (Almer et al., 2001).

Bei ALS-Patienten kommt es zu einer systemischen Degeneration der Motoneuronen (MN). Diese sind die längsten Zellen des Menschen, die einen hohen Energiebedarf haben und damit eine gesteigerte mitochondriale Aktivität. Ein Mangel an Ca^{2+} puffernden Proteinen und eine niedrige Expression der GluR2-Rezeptoruntereinheit des AMPA-Rezeptors können die MN besonders vulnerabel für Exzitotoxizität machen. Die Motoneuronen haben des Weiteren eine hohe Expression des Glutamattransporters EAAT2 und der SOD-1 zur Beseitigung freier Radikale. Kommt es zu genetischen oder post-translationalen Veränderungen in diesen Enzymen, sind die Motoneuronen besonders betroffen (Shaw/Eggett, 2000). Auf Grund ihrer Länge sind die motorischen Nervenzellen zur Stabilisierung mit einer hohen Zahl an Neurofilament ausgestattet. Glutamat ist wiederum an der Expression, der Distribution und Phosphorylierung der Neurofilamente beteiligt und kann damit die Zelle für neurotoxische Mechanismen sensibilisieren. Die Schäden im Neurofilament

der Zellen unterstreichen besonders die Selektivität, mit der die ALS den menschlichen Organismus schwächt, indem nur die motorischen Neuronen davon betroffen sind (Heath/Shaw, 2002).

ALS-ähnliche Symptome zeigten sich überraschenderweise in einem Mausmodell mit einer VEGF-Genmutation. Der zelluläre Wachstumsfaktor konnte auf Hypoxie nicht mehr adäquat reagieren. VEGF ist ein Wachstumsfaktor, der das Wachstum und die Permeabilität der Blutgefäße kontrolliert und versucht, einen niedrigen Sauerstoffpartialdruck mit der Bildung neuer Blutgefäße zu kompensieren. Folgen der verminderten Aktivität des Wachstumsfaktors sind Schäden im Neurofilament, Axondegeneration und Muskelatrophie. VEGF scheint somit neben der Stimulation der Bildung neuer Blutgefäße auch eine neuroprotektive Funktion zu haben. Gleichfalls bestätigen die Beobachtungen im Mausmodell die besondere Anfälligkeit der Motoneuronen gegenüber Hypoxie und Mangelversorgung (Cleveland, 2003).

Die beschriebenen Hypothesen sind weniger als kausale Alternativen bei der Entstehung der ALS anzusehen. Vielmehr scheinen der Zeitpunkt und die Selektivität der Motoneuronenschädigung durch das ungünstige Nebeneinander der Faktoren bedingt zu sein, die alle das Krankheitsrisiko erhöhen. Der hohe Energieumsatz der Motoneuronen, die Glutamatexzitotoxizität, die gestörte Ca^{2+} -Homöostase und der oxidative Stress, dem die Zelle ausgesetzt ist, führen zu einer Aktivierung des Enzyms p53 und damit zur Einleitung der Apoptose. Folge dieser gehäuft auftretenden Zelltode und das Unvermögen der übrigen Nervenzellen durch Zellteilung Ersatz zu schaffen, mündet in eine symptomatisch werdende Neurodegeneration.

Für einzelne neurodegenerative Erkrankungen ist ein Defekt im DNA-Reparatursystem bekannt. Besonders deutlich wird das bei dem Instabilitätssyndrom der Ataxia telangiectasia. Bei dieser Erkrankung ist die chromosomale Instabilität nicht auf die Neuronen beschränkt, sondern auch in Lymphozyten nachweisbar. Es wurden Mutationen in den Reparaturgenen beschrieben. In anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie dem M. Parkinson und der Demenz von Alzheimer-Typ, in denen bisher keine verantwortlichen Genmutationen entdeckt wurden, hat man oxidative DNA-Schäden und eine erhöhte Apoptoseaktivität im neuronalen Gewebe nachweisen können.

Migliore et al. schlussfolgerten, da man sowohl im ZNS als auch im Blut von Parkinsonpatienten Zeichen von oxidativem Stress nachweisen konnte, dass auch in

Lymphozyten von einer erhöhten Konzentration freier Radikale auszugehen ist. Mittels Mikronukleus, FISH und einem *comet assay* konnten in den Lymphozyten von Parkinsonpatienten DNA-Schäden, die auf oxidativen Stress zurückzuführen sind, nachgewiesen werden (Migliore, 2002).

Zytogenetische Untersuchungen an Patienten mit sporadischer ALS lieferten den Befund erhöhter konstitutioneller Aberrationen unter den Patienten, ebenso wurden Einzelfälle beschrieben, die unterschiedlichste somatische Aberrationen aufwiesen (Meyer et al., 2003). Die Möglichkeit einer oxidativen Schädigung des Genoms mit der Folge einer chromosomalen Instabilität auf der einen Seite und der selektiven Apoptose von Motoneuronen auf der anderen Seite gaben Anlass zu den erfolgten zytogenetischen Untersuchungen der Patienten. Eine chromosomale Instabilität hätte die Heterogenität der beobachteten somatischen Aberrationen erklären und ein weiterer Risikofaktor für die Pathogenese der ALS sein können.

Die Untersuchungen der sALS-Patienten ergaben keinen Anhalt für das Vorliegen einer chromosomalen Instabilität. Dennoch ist eine genetische Heterogenität im Sinne dominanter Neumutationen nicht ausgeschlossen. Einen weiteren Beitrag zur Aufklärung der pathogenetischen Bedeutung der bisher beschriebenen konstitutionellen Aberrationen und die mögliche Identifizierung der Kandidatengene der ALS könnte eine Untersuchung der beteiligten Chromosomen liefern. Eine Bruchpunktanalyse könnte Aufschluss über die Funktionen der beteiligten Gene und ihrer Proteine geben. Ebenso sollte die systematische zytogenetische Analyse der ALS-Patienten fortgeführt werden, um weitere ALS-assoziierte Chromosomenaberrationen zu identifizieren.

Literaturverzeichnis

- Almer G, Guegan C, Teismann P, Naini A, Rosoklija G, Hays AP, Chen C, Przedborski S: Increased expression of the pro-inflammatory enzyme cyclooxygenase-2 in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology* 2001; 49(2):176-185.
- Barch MJ: The ACT ,Cytogenetics Laboratory Manual 2, New York Raven Press 1991.
- Barzilai A, Yamamoto K DNA: Damage responses to oxidative stress. *DNA repair* 2004; 3:1109-1115.
- Bensimon G, Lacomblez L, Meininger VA: Controlled trial of Riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *New England Journal of Medicine* 1994; 330(9):636-637.
- Bickmore WA, Teague P: Influences of chromosome size, gene density and nuclear position on the frequency of constitutional translocations in the human population. *Chromosome research* 2002; 10:707-715.
- Bogdanov M et al.: Increased oxidative damage to DNA in ALS-Patients. *Free radical biology & medicine* 2000; 29 (7):652-658.
- Brooks BR: El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial "Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis" workshop contributors. *Journal of Neurological Science* 1994; 124:96-107.
- Caldecott KW: DNA single-strand breakage and neurodegeneration. *DNA repair* 2004; 3:875-882.
- Cleveland JL: A new piece of the ALS puzzle. *Nature Genetics* 2003; 34(4):357-358.

- Delank HW., Gehlen W: Neurologie 8.Auflage, Enke 1999.
- Desnuelle C, Dib M, Garrel C, Favier A: A double-blind, placebo-controlled randomized clinical trial of alfa-tocopherol (vitamin E) in the treatment of ALS. ALS riluzole-tocopherol Study Group. ALS and other Motor Neuron Disorders 2001; 2(1):9-18.
- Facchinetti F, Dawson VL, Dawson TM: Free radicals as mediator of neuronal injury. Cellular and Molecular Neurobiology 1998; 18 (6):667-682.
- Graf M et al.: High dose vitamin E therapy in ALS as add-on therapy to riluzol: results of a placebo-controlled double-blind study. Journal of neural transmission 2005; 112(5):649-660.
- Heath PR, Shaw PJ: Update on the glutamatergic neurotransmitter system and the role of excitotoxicity in ALS. Muscel and Nerve 2002; 26:438-458.
- Hugon J: Riluzole and ALS therapy. Wiener medizinische Wochenschrift 1996; 146 (9-10):185-187.
- Mitelman F: An international System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel S.Karger 1995
- Kaneko K, Saito F, Sunohara N, Ikeuchi T: Cytogenetic analysis of 23 Japanese patients with amyotrophic lateral sclerosis. Clinical genetics 1995; 47(3):158-160.
- Martin LJ: p53 is abnormally elevated and activated in the CNS of patients with amyotrophic lateral sclerosis. Neurobiological Dissertations 2000; 7:613-622.
- Mathur R, Cowdhury MR, Singh G: Recent advances in chromosome breakage syndromes and their diagnosis. Indian pediatrics 2000; 37(6):615-625.
- Meyer T et al.: High rate of constitutional chromosomal rearrangements in apparently sporadic ALS. Neurology 2003; 60:1348-1350.

- Migliore 2002 Migliore BS, Petrozzi L, Lucetti C, Gambaccini G, Bernardini S, Scarpato R, Trippi F, Barale R, Frenzilli G, Rodilla V, Bonuccelli U: Oxidative damage and cytogenetic analysis in leukocytes of Parkinson's disease patients. *Neurology* 2002; 58:1809-1815.
- Neundörfer B.: Praxis der Amyotrophen Lateralsklerose. 1. Auflage, Bremen 2002.
- Rolig RL, Mckinnon PJ: Linking DNA damage and neurodegeneration. *Trends in Neuroscience* 2000; 23:417-424.
- Rosen DR et al.: Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993; 362(6415):20-21.
- Sathasivam S, Ince PG, Shaw PJ: Apoptosis in ALS: a review of the evidence. *Neuropathology and applied neurobiology* 2001; 272:57-274.
- Schmidt R.F., Thews G: Physiologie des Menschen. 28. Auflage, Berlin 2000.
- Seyffert W, Gassen HG, Hess O, Jäckle H, Fischbach K-F: Lehrbuch der Genetik. Ulm 1998.
- Shaikh AY, Martin LJ: DNA base-excision repair enzyme apurinic/apyrimidinic endonuclease/redox factor-1 is increased and competent in the brain and spinal cord of individuals with ALS. *Neuromolecular Medicine* 2002; 2 (1):47-60.
- Shaw PJ, Eggett CJ: Molecular factors underlying selective vulnerability of motor neurons to neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurology* 2000; 247:17-27.
- Sperling K, Neitzel H: Chromosomopathien. Ganten, Ruckpaul: Handbuch der molekularen Medizin. Monogen bedingte Erbkrankheiten, Teil 2 Berlin 2000, S.43-77.

- Sperling K, Neitzel H: Zytogenetische Grundlagen der molekularen Medizin. Ganten, Ruckpaul: Grundlagen der molekularen Medizin2. Berlin 2003, S.54-88.
- Tateno M et al.: Calcium-permeable AMPA receptores promote misfolding of mutant SOD1 protein and development of ALS in a transgenic mouse model. Human Molecular Genetic 2004; 13(19):2183-96.
- Therman E, Susman M: Human Chromosomes. Structure, behavior and effects. 3rd edition, New York 1993.
- Tönnies H: Modern molecular cytogenetic techniques in genetic diagnostic. Trends in molecular medicine 2002; 8:246-250.
- Uberti D, Toninelli GF, Memo M: Involvement of DNA damage and repair systems in neurodegenerative process. Toxicology letters 2003; 139:99-105.
- Ulitzkaja L: Ein fröhliches Begräbnis. Roman. 2.Auflage, Berlin 2003, S.59.
- Venter JC et al.: The sequence of the human genome. Science 2001; 291(5507):1304-1351.
- Wong PC et al.: An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. Neuron 1995; 14(6):1105-1116.
- www.als-charite.de.
- www.uni-kl.de/FB-Biologie/AG-Zankl/chrab.html.
- Zhu X et al.: Oxidative stress signalling in Alzheimer's disease. Brain research 2004; 1000:32-39.

Anhang

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich in meiner Arbeit unterstützt und ermutigt haben. Insbesondere gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Thomas Meyer, der mir die Arbeit an dieser Erkrankung ermöglicht hat und sie von Seiten der Neurologie betreut hat.

Danken möchte ich Frau Prof. Dr. Heidemarie Neitzel für die Möglichkeit, die zytogenetischen Untersuchungen am Humangenetischen Institut im Campus Virchow Klinikum der Charité durchzuführen. Für die humangenetische Betreuung dieser Arbeit bin ich ihr sehr dankbar.

Den Mitarbeitern der Chromosomendiagnostik danke ich für die Geduld beim Vermitteln der Methoden. Besonders möchte ich Herrn Dr. Holger Tönnies für die wissenschaftliche Betreuung der zytogenetischen Untersuchungen und für seine Beratung danken.

Nicht zuletzt wäre diese Arbeit ohne die liebenswerte Bereitschaft der Patienten und Kontrollpersonen, sich für die Untersuchung zur Verfügung zu stellen, nicht möglich gewesen. Deshalb gilt ihnen mein besonderer Dank.

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Juliane Christin Wappler, erkläre, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift mit dem Thema: *Untersuchung somatischer Chromosomenveränderungen bei amyotropher Lateralsklerose* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum, Unterschrift